# Untersuchungen
## über
# Bakterienautolyse

**Über die Abhängigkeit der Autolyse des Bakteriums Proteus X-19 und des Bakteriums Coli Commune von physikalisch-chemischen und biologischen Faktoren**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde

von

PARASKEVI EVANGELINOS

3. V. 1940

M 56

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548011_0217

Aus der Seuchenabteilung des Instituts „Robert Koch“, Berlin
Abteilungsleiter Prof. Dr. med. habil. et phil. T. Wohlfeil

# Untersuchungen über Bakterienautolyse

## Über die Abhängigkeit der Autolyse des Bakteriums Proteus X-19 und des Bakteriums Coli Commune von physikalisch-chemischen und biologischen Faktoren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin

vorgelegt von

**PARASKEVI EVANGELINOS**

aus Athen, Griechenland

Tag der Promotion: 3. V. 1940

1940

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin
Dekan: Prof. Kreuz
Referent: Prof. Dr. Heinrich Zeiss

In Dankbarkeit gewidmet

dem hochverehrten Herrn Minister

**Κ. ΚΟΤΖΙΑΣ**

und

Herrn Generaldirektor des

Athener Rathauses

**Δ. ΠΕΤΑΛΙΔΑΣ**

# EINLEITUNG

Der von Salkowsky unter dem Namen Autodigestion (1891) und dann später von Jacobi unter dem Namen Autolyse bezeichnete Vorgang, unter dem wir nach dem Ableben der Zelle eine Selbstauflösung bzw. Selbstverdauung der organischen Bestandteile unter Aufhören der normalen chemischen Funktionen, die für das Leben notwendig sind, verstehen, ist schon früher häufig Gegenstand der Untersuchung bei menschlichen und tierischen Geweben gewesen. Über die Selbstauflösung von Bakterien und anderen einzelligen Organismen lagen bisher nur verhältnismäßig wenig Beobachtungen und Theorien vor (Kruse). Vor allem fehlten bisher exakte quantitative Untersuchungen über die Größe und Geschwindigkeit der bakteriellen Autolyse, sowie über die sie beeinflussenden Faktoren.

Ich habe daher auf Veranlassung von Herrn Prof. Wohlfeil (Institut Robert Koch) mit der Erforschung der bakteriellen Autolyse angefangen, über deren Ergebnisse ich im folgenden berichten werde.

Der Anstoß zur Durchführung derartiger Untersuchungen über bakterielle Autolyse ergab sich zunächst aus folgenden Überlegungen: Einmal war es aus der Praxis der Impfstoffherstellung und Konservierung bakterieller Impfstoffe bekannt, daß einige von diesen (Cholera, Typhus) im Laufe der Zeit zu autolysieren pflegten. Wir hielten es daher für erforderlich, festzustellen, welche Bedingungen an dieser Autolyse der bakteriellen Impfstoffe schuld waren. Zu diesem Zweck waren neue Untersuchungen über Autolyse unter klar übersehbaren Versuchsbedingungen unbedingt erforderlich. Weiterhin konnten solche Autolyseversuche auch in fermentchemischer Hinsicht neue Ergebnisse bringen. Die Abgabe proteolytischer Fermente sollte nach Dernby und anderen Autoren bei den meisten Bakterien erst nach ihrem Absterben einsetzen, da schnell autolysierende Bakterien in der Regel stärker Eiweiß spalten als geringgradig autolysierende. Neuerdings hatte Janke andererseits jedoch auch bedeutende Beweise für eine echte Enzymsekretion proteolytischer Enzyme ohne vorherige Autolyse beigebracht. Veranlaßt durch verschiedene neue Berichte über Autolyse bei pflanzlichen und tierischen Organismen (u. a. Haen L. Bergwalt und Teschner) wie auch durch Arbeiten über proteolytische und andere Enzyme bei Bakterien (Furmann, Oppenheimer, Dernby, Jakoby, Gorini, Graßmann, Schneider, Virtanen, Wagner-Jauregg, Janke, Gorbach, Euler, Myrrbach, Maschmann, Wohlfeil u. a.) haben wir auch aus diesen theoretischen Gründen die Neubearbeitung dieses Gebietes für lohnend befunden.

Die allgemeine Problemstellung meiner Arbeit war demnach folgende: Inwieweit und unter welchen Bedingungen können autolytische Prozesse bei den Bakterien stattfinden und welches sind die Faktoren, die dieses nach dem Absterben der Zelle auftretende Phänomen befördern oder hemmen?

Seit der Zeit von Berzelius (1836), wie auch des Franzosen Planche (1810—1820) und nachher Liebig und Pasteur, war schon bekannt, daß sich in der belebten Materie „Agenzien" befinden, die mit der Struktur der Zellen verknüpft sind und eine große Rolle bei allen biologischen Vorgängen spielen.

Diese von Mittasch (1936) neuerdings besonders hervorgehobenen Katalysatoren der lebenden Vorgänge sind die Fermente oder Enzyme — nach der Entdeckung Buchners (1897) über den Enzymkomplex der alkoholischen Gärung ist heute eine Unterscheidung zwischen Fermenten und Enzymen nicht mehr zulässig —, die offenbar auch von vielfach nach dem Tode der Zelle, infolge Auflösung der Zellstruktur, ihre Funktionen auf den Stoff ausüben.

Durch verschiedene verfeinerte Arbeiten, erst von Willstaedter, dann von Northrop (1929—1931), Warburg 1932, Anson 1935, Kuhn 1937, ist uns heute die chemische Struktur dieser die biologischen Funktionen des Organismus beherrschenden Faktoren teilweise bekannt geworden. Wir wissen heute, daß diese Stoffe besondere Systeme darstellen, und daß sie teilweise auch bei Veränderung der normalen Zellstruktur eine meist quantitative Veränderung ihrer Funktionen erleiden, die entweder als Hemmung oder als Förderung ihrer Originalfunktionen zum Vorschein kommen kann.

Es sind über die Konstitution der Fermente 2 Theorien aufgestellt worden: die sogenannte unitarische Theorie und die dualistische Theorie. Letztere hat heute die meisten Anhänger. R. Willstaedter und seine Schüler haben diese Theorie in den Jahren 1922—1927 ausgebaut. Zuerst aber wurde sie von Perrin (1907) und von Matheus und Klenn diskutiert. Die dualistische Theorie besagt, daß ein wirksames Enzym aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht, die eine spezifisch katalytische Wirkung bedingt. Erst durch Verkettung der meist niedriger molekularen aktiven Gruppe mit dem hochmolekularen Träger wird die Aktivität des Enzyms zur vollen Intensität gesteigert. Der Träger aber kann verschieden sein und kann Verschiebungen in der Affinität und der Spezifität der Wirkung ausüben. Das gesamte Enzymsystem, also aktive Gruppe und Träger, bezeichnet R. Willstaedter und Rodenwaldt als Symplex.

Diese Theorie wurde durch viele bedeutende Arbeiten bestätigt (Warburg, v. Euler, Kuhn, Theorell, B. Hand, Kraut, M. Florkin

u. a. m.). Neben obiger Nomenklatur der Fermente steht in der Literatur noch eine andere, die von K. Kraut und von Pantschenko-Jurewicz (1936) stammt. Danach wird die aktive Gruppe als „Agon", der Träger als „Pheron" und das ganze System als „Simplex" bezeichnet.

Die drei Komponenten eines Enzymsystems sollen in einem durch das Massenwirkungsgesetz geregeltem Gleichgewichtszustand stehen

$$\frac{\text{Agon} + \text{Pheron}}{\text{Symplex}} = \text{konstant},$$

wobei die Konstante bei verschiedenen Fermenten verschieden ist.

Es besteht noch eine 3. Nomenklatur, die in der Fermentchemie neuerdings am gebräuchlichsten geworden ist. Diese wurde von H. von Euler und K. Myrrbäck (1923) eingeführt. Das aktive Gesamtferment wird als Holoferment, die beiden inaktiven Bruchstücke, in welche das Holoferment dissozieren kann, als Apo-Ferment und Co-Ferment (z. B. Apo-Dehydrase + Co-Dehydrase = Holodehydrase) bezeichnet. Demnach ist das Co-Ferment und die aktive Gruppe mit dem Agon identisch, das Apo-Ferment mit dem Träger, bzw. dem Pheron. Das Holoferment entspricht dem Symplex.

Eine weitere Frage ist nun, durch welche Bedingungen die Fermente oder besser gesagt die verschiedenen Fermentkomplexe verändert, gehemmt oder befördert werden. Durch die fundamentalen Untersuchungen von Sörensen ist bekannt geworden, daß für die verschiedenen Fermentreaktionen die Wasserstoffionen-Konzentration des Milieux von größter Bedeutung ist. Darüber hinaus kennt man seit langem eine weitere Reihe von physikalischen und physikalisch-chemischen Faktoren, die Fermentreaktionen entweder hemmen oder beschleunigen. Dazu gehören vor allem Temperatur, osmotischer Druck und Anionen- und Kationenzusammensetzung des Milieux, in welchem die Fermentreaktionen vor sich gehen. Wir hatten uns daher, wie schon oben erwähnt, auch in bezug auf die Autolyse die Aufgabe gestellt, zu prüfen, welche physikalischen und physikalisch-chemischen Faktoren eine Hemmung oder Förderungswirkung auf die Bakterienautolyse ausüben.

## KAPITEL I.

# METHODIK UND VORVERSUCHE

Um einen vorläufigen Eindruck von dem Verlauf der Autolyse zu bekommen, haben wir zunächst Vorversuche mit Kochsalzaufschwemmungen von Kulturen des Bact. vulgare Proteus X-19 (O-Form) gemacht. Dieses Bakterium ist wegen seiner bekannten leichten Autolysierfähigkeit ein besonders günstiges Versuchsobjekt.

Jede Autolyse führt zur Zersetzung des Bakterieneiweißes und damit zu seiner Löslichkeitserhöhung. Als Endprodukt dieser Autolyse wird jedenfalls die Bakterienzelle aufgelöst und das gesamte strukturierte, ungelöste Eiweiß der lebenden Bakterienzelle geht schließlich in strukturloses gelöstes Eiweiß über. Aus diesem Grunde ist die Bestimmung des gelösten strukturlosen Eiweißes in einer Bakterienaufschwemmung ein Maß dafür, wieviel Bakterien autolysiert sind. In methodischer Hinsicht galt es daher zunächst, ein Verfahren auszuarbeiten, um das autolytisch gelöste Bakterieneiweiß in einer wässrigen Bakteriensuspension von dem Bakterieneiweiß der nicht aufgelösten, toten oder lebenden Bakterien abzutrennen. Diese Trennung haben wir durch Zentrifugieren mit hochtouriger Zentrifuge (10 000 Touren) erreicht. Einzelheiten sind im folgenden Abschnitt ersichtlich.

**Methodik:** Abschwemmungen von 24 stdg. Proteus-O-Form-Kulturen wurden dreimal mit 0,85%iger Kochsalzlösung gewaschen, damit auch die kleinsten Spuren von Agar entfernt wurden. Das Waschen geschah durch zweimaliges Zentrifugieren in einer dreitausendtourigen Zentrifuge, je $^1/_2$ Stunde. Für den Autolyseversuch wurde der Bodensatz mit 150 ccm Kochsalzlösung in chemisch reine Röhrchen aufgenommen und über bestimmte Zeiten bei $37^0$ bebrütet. Vor Beginn der Autolyse haben wir eine sofortige Kontrollbestimmung des gelösten Eiweißes, bzw. Stickstoffes in dem Suspensionsmedium gemacht und dann weitere Bestimmungen nach 24-, 48-, 72-, 96- und 120stündiger Bebrütung bei $37^0$ angeschlossen. Die Autolyse ging in einer praktisch anaeroben Atmosphäre vor sich. Die zu prüfende Bakteriensuspension wurde stets in Zentrifugengläsern bebrütet, welche bis oben gefüllt und mit einem paraffinierten Wattestopfen luftdicht abgeschlossen waren. Nach obigen Bebrütungszeiten oder auch für die erste Kontrolluntersuchung wurde der Inhalt der Röhrchen bei 10 000 Umdrehungen der Zentrifuge scharf zentrifugiert die überstehende Flüssigkeit abgenommen und zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Da gläserne Zentrifugenröhrchen bei einer solchen hochtourigen Zentrifuge häufig zerbrechen, sind wir später dazu übergegangen, Zentrifugengefäße aus Kruppschem V2A-Stahl zu benutzen. Die Reinigung der V2A-Stahlgefäße konnte natürlich nicht mit Kaliumbichromatschwefelsäure, wie bei den Glasversuchen, vorgenommen werden. Sie wurden unmittelbar nach dem Gebrauch, d. h. während die ausgeschleuderten Bakterien noch wasserhaltig in dem Bodensatz waren, mit einer weichen Bürste mechanisch gesäubert und anschließend unter dem scharfen Wasserstrahl so lange gereinigt, bis die geschliffenen Metallflächen völlig glänzend waren und mit aqua dest. nachgespült und getrocknet. Vor der Reinigung wur-

den die Zentrifugengläser erst ca. 1 Stunde durch Einlegen in Zephirollösung desinfiziert.

Die Methode der N-Bestimmung nach Kjeldahl wurde in folgender Weise durchgeführt: 5 ccm von der praktisch bakterienfreien Flüssigkeit waren mit 1 ccm chemisch reiner rauchender Schwefelsäure und 10—14 Tropfen 10%iger Kupfersulfatlösung erst im Kjeldahlkolben (chemisch rein) 1/4 Stunde lang verascht, dann 1/4 Stunde lang in einer Mikro-Kjeldahlapparatur destilliert worden. Als Vorlage benutzten wir 10 ccm einer 1/100 normal Schwefelsäure. Nach Ablauf der Destillationszeit wurde die Vorlage mit 1/100 n Natronlauge titriert. Als sehr empfindlicher Indikator wurde entsprechend den Angaben von Clark eine Mischung von Methylenblau-Lösung (0,25 g Methylenblau gelöst in 1000 ccm 50%igem Äthylalkohol) und Methylrot-Lösung (gesättigte Lösung in 50%igem Äthylalkohol) verwendet, und zwar in Mischung von 3 Teilen Methylrot und 2 Teilen Methylenblau. Die betreffende Mischung gibt in saurem Milieu blauviolette Färbung und in alkalischem Milieu tiefgrüne Färbung. Der Umschlag ist sehr scharf und geschieht noch bei 1 Tropfen 1/200 Lösung. Alle gebrauchten Pipetten, wie auch Kolben waren chemisch rein vorbereitet. Die Chemikalien wurden alle chemisch rein von den Firmen Schering-Berlin und Merck-Darmstadt bezogen. Schwefelsäure für die Veraschung war rauchend ca. 7% Anhydrid, N-frei geeignet für die Kjeldahlbestimmung, wie auch Natronlauge N-frei, spez. Gewicht 1,35 (ca. 33% NAOH) für Kjeldahlbestimmung. Für die Destillation für jeden Zusatz von aqua dest. und für die Herstellung unserer Lösungen haben wir immer bidestelliertes Wasser gebraucht, und zwar sorgfältig frei von $CO_2$ und Ammoniak. Die zur Titration gebrauchte 50 ccm Bürette mit 1/100 ccm-Einteilung war an eine 2-Liter-Flasche angeschlossen, in der sich die n/100 Natronlauge befand, die durch eine Natronkalkvorlage streng vor Luft-$CO_2$-Eindringen geschützt war. Die Menge der verbrauchten n/100 Natronlauge wurde abgezogen von der Zahl der Menge der vorgelegten Schwefelsäure (d. h. von 10 ccm). Da wir aber für jede Bebrütungszeit, um genaue Resultate zu erhalten, drei Bestimmungen von derselben Flüssigkeit durchgeführt haben, habe ich nach der Titration die drei erhaltenen Analysenzahlen addiert und durch drei dividiert und dann das Resultat von der Zahl zehn abgezogen. Jedesmal wurde zur Sicherheit der Titer unserer n/100 Schwefelsäure vor der Haupttitration bestimmt. Die nach der Destillation durch Ammoniak-N verbrauchte Schwefelsäure, aus der Ammoniumsulfat entstanden war, wurde mit 0,14 multipliziert. Die Zahl 0,14 bedeutet die Stickstoffmenge, die 1 ccm 1/100 Natronlauge entspricht.

Schon unsere ersten Versuche haben positive Resultate ergeben,

und wir haben noch weitere Versuche mit Kochsalzaufschwemmung angestellt. In der ersten Serie hatten wir Stickstoffvermehrung schon nach der ersten Bebrütungszeit von 24 Stunden beobachtet. Das Maximum der Vermehrung des autolytisch entstandenen Eiweißes ergab sich nach 96stündiger Bebrütung. Bei dem zweiten Versuch war das Maximum ebenfalls nach 96stündiger Bebrütung eingetreten und auch auf gleicher Höhe bis zu 120 Stunden geblieben. Aus Tabelle I und II sind alle Einzelheiten ersichtlich.

**Proteusversuch**

**Tabelle I: Kochsalzserie I**

| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle |
|---|---|---|
| Sofort ..... | 0,070 | — |
| Nach 24 Stunden | 0,29 | + 0,220<br>+ 314% |
| Nach 48 Stunden | 0,28 | + 0,210<br>+ 300% |
| Nach 72 Stunden | 0,33 | + 0,260<br>+ 371% |
| Nach 96 Stunden | 0,44 | + 0,356<br>+ 508% |
| Nach 120 Stunden | 0,29 | + 0,220<br>+ 314% |
| Nach 140 Stunden | 0,35 | + 0,280<br>+ 400% |
| | | |

**Tabelle II: Kochsalzserie II**

| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle |
|---|---|---|
| Sofort ..... | 0,084 | — |
| Nach 24 Stunden | 0,39 | + 0,306<br>+ 364% |
| Nach 48 Stunden | 0,47 | + 0,386<br>+ 459% |
| Nach 72 Stunden | 0,33 | + 0,246<br>+ 292% |
| Nach 96 Stunden | 0,50 | + 0,416<br>+ 495% |
| Nach 120 Stunden | 0,50 | + 0,416<br>+ 495% |
| Nach 142 Stunden | 0,50 | + 0,416<br>+ 495% |
| Nach 160 Stunden | 0,33 | + 0,246<br>+ 292% |

KAPITEL II.

# BEDEUTUNG DER AKTUELLEN REAKTION FÜR DIE BAKTERIENAUTOLYSE

Es ist schon von Sörensen festgestellt worden, daß die H-Ionenkonzentration bei Fermenten eine wichtige, ja eine überhaupt wesentliche Rolle spielt, und daß jedem Ferment ein Reaktionsoptimum zukommt. Bei allen kinetischen Enzymstudien ist daher die Einhaltung einer bestimmten günstigen H-Ionenkonzentration von der größten Bedeutung. Da meist schon recht geringfügige Abweichungen der H-Ionenwerte die Enzymreaktionen beeinflussen, ist es notwendig, die Reaktion durch Puffergemische festzulegen,

damit die Versuche, zu einem befriedigenden Einblick in die Enzymreaktionen zu gelangen, erfolgreich werden.

Der große Einfluß der H- bzw. OH-Ionen auf die Enzyme ist von Michaelis und Davidsohn so aufgefaßt (und zwar nach den Versuchen mit Invertase), daß das Enzym ein amphoterer Elektrolyt sei, dessen undissoziierter Anteil die fermentative Wirkung entfaltet. Auf Grund neuerer Untersuchungen von v. Euler, Josephson und Myrbäck ist man heute zu der Ansicht geneigt, daß für die Reaktionsgeschwindigkeit die Konzentration der undissoziierten Moleküle einer komplexen Säure maßgebend ist, deren Dissoziation wiederum von der Dissoziation der Invertase abhängt. Ist es bei dem Beispiel der Invertasewirkung die Elektrolytnatur des Enzyms, welche für die Aktivität des Reaktionssystems bestimmend zu sein scheint, so steht bei manchen proteolytischen Fermenten anscheinend die im Verhältnis zu den Kohlehydraten weit ausgeprägtere Elektrolytnatur des Substrates, also dessen Dissoziation in Abhängigkeit von der Reaktion, mehr im Vordergrund. Schon die Tatsache, daß das Ph-Optimum für ein und dasselbe Enzym hier von Substrat zu Substrat verschieden sein kann, spricht dafür, daß jedenfalls nicht allein die Dissoziation des Enzyms entscheidet.

Der Zusammenhang zwischen dem Einfluß der Reaktion und der Substratsdissoziation bei den Proteasen geht besonders deutlich aus den Versuchen von Northrop (Northrop Jour of gen. physiol. 5, 263, 1922) mit Pepsin und Trypsin hervor. Andererseits gibt es aber auch proteolytische Fermente, welche das Eiweiß gerade im Punkt minimaler Dissoziation, d. h. bei isoelektrischer Reaktion des Eiweißes am stärksten angreifen, wie z. B. die (E. M. Fränkel, Journ. of biol. chem. 31.201, 1917) Leberprotease bei der Spaltung von Edestin oder Eieralbumin. Auch die Resultate der Arbeiten von R. Hahn und Harpuder sprechen entgegen der Auffassung von Michaelis (H. Hahn und Harpuder, Zeitschrift f. Biol. 71 302, 1920).

Hauptvertreter derjenigen Proteasen, die im isoelektrischen Punkt bei minimaler Dissoziation wirken, sind die Papainasen (Pflanzenproteasen) und die Katepsinasen. Diese Gruppe der Enzyme zeigt nach den Ergebnissen bedeutender Arbeiten (Willstätter-Graßmann, Mendel und Bood-Maschmann, Karrer und Zehender, Waldschmidt, Leitz, Bersin, H. Jörgesen u. a.) sehr interessante Eigenschaften bei ihrer Wirkung, so daß diese Arbeiten für die spezielle Gruppierung der verschiedenen Proteasen sehr beigetragen haben. Die Proteasen vom Typus des Papains bzw. Katepsins zeigen eigentümliche Hemmungs- und Wirkungsvorgänge durch verschiedene Faktoren, und zwar durch HCN, $H_2S$ und Vitamin C (Karreski und Purr), so daß Maschmann und Helmert veranlaßt wurden, die verschiedenen Aktivatoren in zwei Typen zu unterscheiden, und zwar diejenigen,

die lediglich eine Erhöhung der Spaltungsgeschwindigkeit hervorrufen, und zweitens diejenigen, die eine wirkliche Aktivierung der Proteinasen unter Erweiterung der Spezifitätsbereiche bewirken. Aus der von Graßmann und Mitarbeitern (Graßmann, Dykerhoff und Schoenbeck) aufgefundenen Aktivierung mit Sulfhydrylverbindungen und auf Grund der Identifizierung der Zookinase der tierischen Organe (Waldschmidt-Leitz: und der Phytokinase der Hefeproteinase (Graßmann, Schoenbeck) mit Gluthation konnte geschlossen werden, daß die natürliche Aktivierung dieser Proteinasen hauptsächlich durch Sulfhydrylverbindungen erfolgt.

Von Graßmann wurde darum die schon längst bekannte aktivierende Wirkung der Blausäure auf die Aufspaltung dissulfidhaltiger Begleitsubstanzen des Papains in aktive Sulfhydrylverbindungen zurückgeführt (Graßmann), was neuerdings durch Maschmann bestätigt worden ist. Die Weiterentwicklung dieser Anschauung auf Grund von Befunden über teilweise reversible Inaktivierung mit Oxydationsmitteln führte zur Postulierung der Thiolstruktur für das Papain (Bersin).

Das aktive Papain soll Thiolstruktur und das inaktive Disulfidcharakter besitzen. Für diese Auffassung kann angeführt werden, daß die Aktivität der Papainpräparate mit dem Jodbindungsvermögen, d. h. der Anwesenheit von SH-Bindungen parallel geht (Bersin). Eine Hauptstütze dieser Theorie bildet aber vor allem die Auffindung der reversiblen Inaktivierung durch Oxydationsmittel oder Verbindungen, die mit SH-Gruppen einhergehen. Bersin und Mothy konnten nämlich durch $H_2O_2$ inaktivieren und mit Reduktionsmitteln reaktivieren. Gleiches wurde neuerdings durch Purr bestätigt (Verschwinden und Wiederauftreten der SH-Reaktion), der außerdem nach reversibler Inaktivierung durch Alloxan, Methylglyoxal und das dehydrierende System Dehydrogenase-Hypoxanthin-Peroxydase + $O_2$ hervorrufen konnte. Als geeignete Reduktionsmittel für diese Reaktivierung erwiesen sich $H_2S$, HCN, Gluthation, Cystein (Purr-Bersin-Mothes) das $H_2$ liefernde System Bernsteinsäure — Dehydrase, so daß folgendes Schema aufgestellt werden kann:

$$\begin{array}{ccc} & \xrightarrow{H_2O_2\ \text{Alloxan, Methylglyoxal}} & \\ & \text{Dehydrogenase-System} & \\ \text{PaSH} & \longrightarrow & \text{PaSSPa} \\ \text{aktiv} & \longleftarrow & \text{inaktiv} \\ & \xleftarrow{H_2S\ \text{HCN, Sulfhydryl}} & \\ & \text{Bernsteinsäure-Dehydrase} & \end{array}$$

Dies deckt sich auch mit der aufgefundenen Aktivierung und Inaktivierung durch $H_2$ bzw. $O_2$ in Gegenwart von Pflanzenbrei oder Palladium.

Weiterhin erfolgt eine Hemmung durch CuO und Verbindungen vom Typus RHgX. Diese Hemmung kann durch $H_2S$ und HCN aufgehoben werden (Hellermann und Perkins-. Die Inaktivierung wird mit Bildung von Merkaptiden erklärt, welche durch HCN und gewisse Sulfhydryl-Verbindungen unter Bildung wenig dissoziierter Hg-Verbindungen wieder aufgespalten werden. Auf diese Weise ließen sich allgemein Schwermetallhemmungen durch Bildung von Merkaptid-Verbindungen erklären.

Die sämtlich aufgeführten eigentlichen Aktivierungserscheinungen können also als Reduktionswirkungen angesehen werden und würden entsprechend obiger Theorie auf Aufspaltung von SS-Bindungen des inaktiven Enzyms zu SH-Bindungen des aktiven zu erklären sein. Dabei scheint eine unmittelbare Einwirkung auf das Enzym nur von spezifisch aktiven SH-Gruppen (Gluthation, Cystein) auszugehen, während die Aktivierung durch Blausäure-, Ascorbinsäure-Fe·· Brenztraubensäure-Fe··, Bernsteinsäure-Fe··, Papainbegleitstoff-Fe·· + Fe durch Vermittlung disulfidhaltiger Zwischenkatalysatoren von Eiweiß oder Peptidnatur zustande kommen, deren Mitwirkung nach Purr angenommen werden muß und auch nach den Ergebnissen von Maschmann wahrscheinlich erscheint.

Auf Grund dieser Ergebnisse über die Bedeutung der H-Ionen-Konzentration für die Wirkung der Fermente und insbesondere der Proteasen haben wir pH Versuche auch bei der Autolyse eingeführt. Diese Versuche habe ich, wie folgt, angestellt. Methodik: 24 stündige Proteus- — 0-Form- — Kulturen wurden wieder zunächst mit Kochsalzlösung abgeschwemmt, filtriert und dreimal je $^1/_2$ Stunde nach Waschen mit Kochsalzlösung zentrifugiert. Das Waschen mit Kochsalzlösung, wie auch die vorgeführte Filtrierung hatte den Zweck, auch die geringsten Spuren von Agar zu entfernen. Dann wurden 3 g von der zentrifugierten wasserarmen Kultur für jede pH-Serie mittels einer Analysenwaage in weiten 20 ccm fassenden Bechergläsern abgewogen.

Wie es schon bekannt ist, treten bei der Autolyse sehr bald Säuren verschiedener Art (Milchsäure, Phosphorsäure) auf. Es ist daher zweckmäßig durch Pufferung ein Gleichbleiben der Reaktion zu gewährleisten. Als Pufferlösungen haben wir Phosphatpufferlösungen nach Sörensen hergestellt, und zwar wie folgt:

Für 1/15 molare Lösungen wurden 11,876 g sekundäres Natriumphosphat nach Sörensen genommen und in 1 Liter bidest. Wasser aufgelöst. Für die 1/15 m Lösung von primärem Kaliumphosphat wurde 9,078 g in 1 Liter bidest. Wasser aufgelöst. Aus diesen beiden Lösungen habe ich entsprechend dem Sörensenschen

Pufferdiagramm das Phosphatgemisch bereitet, das einen pH-Bereich von 5,3—8,0 umfaßte. Zur Kontrolle der Richtigkeit unserer Phosphatpufferlösungen haben wir Merk-Indikatorpapier benutzt oder mit m.-Nitrophenol im Walpolschen Komparator den pH nachgeprüft. Von den Phosphatstammlösungen habe ich Lösungen für pH 6,0—8,0 gemacht. Ich habe gemischt

bei pH 6,0 molar 1/15 88 ccm primäre Lösung + 12 ccm sekundäre Lösung,
bei pH 6,5 . . . . . 69 ccm primäre Lösung + 31 ccm sekundäre Lösung,
bei pH 7,0 . . . . . 39 ccm primäre Lösung + 61 ccm sekundäre Lösung,
bei pH 7,5 . . . . . 16 ccm primäre Lösung + 84 ccm sekundäre Lösung,
bei pH 8,0 . . . . . 55 ccm primäre Lösung + 94,5 ccm sekundäre Lösung.

Weil wir aber für unseren Zweck ein dem osmotischen Druck der Bakterienzellen entsprechendes Milieu herstellen wollten, bereiteten wir 1/30 molare Lösungen, zu welchem Zwecke wir die 1/15 molare Lösung 1 : 1 mit aqua bidest. verdünnten. Wie Wohlfeil früher festgestellt hat, entspricht eine 1/30 bis 1/32 m Phosphatpufferlösung ungefähr den Anforderungen an Isotonie gegenüber der Bakterienzelle, d. h. eine solche Lösung hat den gleichen osmotischen Druck, wie eine 0,292 molare Harnstofflösung oder wie eine 0,146 molare = 0,85% Kochsalzlösung. Ich brauchte für jede pH-Versuchsserie 150 ccm Suspensionslösung, denn alle unsere im Brutschrank bebrüteten Kulturgläser hatten einen Inhalt von 20 ccm Flüssigkeit und 6 bis 7 davon mußten für einen Versuch über eine Woche gefüllt werden. Ich benötigte für die chemische Analyse mindestens 16 ccm bakterienfreie Flüssigkeit, damit wir 3 Bestimmungen zu je 5 ccm für jede Bebrütungszeit machen konnten. Auf 150 ccm Phosphatlösung wurde je Serie 3 g abgewogene Bakterienmasse zugesetzt. Die Bakterienkulturen mußten zwecks Herstellung der Suspensionen mit einem chemisch reinem Glasstab in einem Becherglas verteilt und geschüttelt werden, damit nicht ungleiche Bakterienmenge in die Versuchsröhrchen abgefüllt wurden. Damit läßt sich erreichen, daß bei der Bestimmung der Stickstoffmenge aus den Eiweißabbauprodukten der autolysierten Bakterienmenge die Werte für jede Bebrütungszeit vergleichbar waren. Da wegen des verschiedenen Wassergehaltes der Bakterienmasse kleine Wägeunterschiede immer vorhanden sind, kam uns später die Idee, außerdem noch eine direkte Bakterienzählung im Dunkelfeld nach der Methodik von Wohlfeil vorzunehmen. Wie oben erwähnt, sind alle diese pH-Versuche bei $37^0$ Temperatur ausgeführt worden. Die Röhrchen waren zum oberen Rande gefüllt, mit sterilisierter Watte gestopft und dann mit Paraffin luftdicht verschlossen; die Watte war von der Flüssigkeit etwa $^1/_2$ bis 1 ccm entfernt, damit nach Verzehrung des $0_2$ bald eine anaerobe Atmosphäre bestand. Nach der bestimmten Bebrütungszeit wurden die Röhrchen aus dem Brutschrank heraus-

genommen und der Inhalt in Zentrifugengläsern aus Jenaer Glas, später in Kruppschen Stahlgläsern $^1/_2$ Stunde bei 10 000 Umdrehungen zentrifugiert.

Die überstehende bakterienfreie Flüssigkeit habe ich im Kjeldahlkolben verascht. Von jeder pH-Serie sind 3 Bestimmungen mit je 5 ccm Flüssigkeit gemacht worden. Die weitere Ausführung der N-Bestimmung war schon oben bei der Kochsalzserie beschrieben. Die Autolyse wurde nach vorher beschriebener Methodik in 1/30 m Phosphatpufferlösungen von pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 und 8,0 geprüft. In diesen und allen folgenden Versuchsserien sind stets außer den oben erwähnten Proteus-Kulturen noch Kulturen von Bakt. Coli Commune geprüft worden. Bakt. Proteus galt dabei als Typ eines leicht autolysierenden Mikroben, Bakt. Coli als Typ eines schwer autolysierenden Mikroben.

Bei dem ersten Phosphatversuch (Tabelle III) mit Proteus habe ich folgendes beobachtet: Die Stickstoffvermehrung hatte bei pH 6,0 ihr zeitliches Maximum nach 72stündiger Bebrütung, während bei pH 6,5 bis 8,0 das zeitliche Maximum nach 120 Stunden Bebrütung eintrat. Bei Vergleich der verschiedenen pH-Werten wurde ein absolutes Maximum der Autolyse bei pH 8,0 beobachtet. Ich beobachtete, daß bei pH 6,0 eine Verminderung des N nach 96 Stunden eintrat; bei pH 6,5 war die Menge die gleiche geblieben. Bei den anderen pH war die Vermehrung des gelösten N und damit der Autolyse meist graduell mit der Verlängerung der Bebrütungszeit weitergegangen.

Bei dem zweiten Versuch mit Proteus wurde folgendes beobachtet (Tabelle IV): Bei pH 6,0 wie auch bei pH 6,5 geschah das Maximum der N-Vermehrung nach 48 Stunden, und zwar mehr(+ 770%) bei pH 6,0 als bei pH 6,5 (492%). Nach 72 Stunden bei pH 6,0, wie bei 6,5 wurde eine Verminderung der gelösten N-Menge beobachtet, und zwar bei 6,5 stärker als bei 6,0. Die Stickstoffmenge war bei 6,0 größer als bei 6,5, aber die Verminderung war rascher als bei 6,5, und zwar nach 96 Stunden mit einer kleinen Erhöhung der N-Menge nach 120 Stunden. Bei pH 7,0 nach 48 Stunden ist eine Verminderung beobachtet worden und nach 72 Stunden eine Vermehrung, welche die N-Vermehrung nach 24stündiger Bebrütung übertraf. Dann trat wieder eine Verminderung ein, die bis zu 120 Stunden weitergegangen ist. Bei 7,5 war die Vermehrung von Anfang bis zu 120 Stunden fast stetig weitergegangen. Bei 8,0, wo die bedeutend größte Vermehrung des Autolysen-N beobachtet wurde, war diese ebenfalls von Versuchsbeginn bis Versuchsende gleichmäßig weitergegangen. Aus den beiden Versuchsserien kann man schließen, daß in der Pufferlösung von 6,0 bis 7,5 eine N-Vermehrung nicht gleichmäßig stattgefunden hat und daß ein Maximum der N-Vermehrung

## Tabelle III: Phosphatserie. Proteus. Versuch mit verschiedenen pH.

**Mol. $^1/_{30}$ bei 37°**

| | pH 6,0 | | pH 6,5 | | pH 7 | | pH 7,5 | | pH 8,0 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle |
| Sofort ..... | 0,075 | — | 0,056 | — | 0,084 | — | 0,056 | — | 0,056 | — |
| Nach 24 Stunden ..... | 0,42 | + 0,345<br>+ 460 % | 0,30 | + 0,244<br>+ 435 % | 0,56 | + 0,476<br>+ 568 % | 0,54 | + 0,484<br>+ 864 % | 0,59 | + 0,534<br>+ 953 % |
| Nach 48 Stunden ..... | 0,32 | + 0,245<br>+ 327 % | 0,49 | + 0,434<br>+ 775 % | 0,75 | + 0,666<br>+ 793 % | 0,75 | + 0,694<br>+ 1240 % | 0,78 | + 0,724<br>+ 1292 % |
| Nach 72 Stunden ..... | 0,60 | + 0,554<br>+ 713 % | 0,60 | + 0,544<br>+ 971 % | 0,79 | + 0,706<br>+ 804 % | 0,88 | + 0,824<br>+ 1471 % | 0,88 | + 0,824<br>+ 1471 % |
| Nach 96 Stunden ..... | 0,50 | + 0,425<br>+ 566 % | 0,60 | + 0,544<br>+ 971 % | 0,91 | + 0,826<br>+ 983 % | 0,95 | + 0,894<br>+ 1596 % | 0,98 | + 0,924<br>+ 1650 % |
| Nach 120 Stunden ..... | — | — | 0,72 | + 0,664<br>+ 1185 % | 1,05 | + 0,994<br>+ 1183 % | 1,02 | + 0,964<br>+ 1721 % | 1,06 | + 1,004<br>+ 1790 % |

## Tabelle IV: Phosphatserie. Proteus. Versuch mit verschiedenen pH.

**Mol. $^1/_{30}$ bei 37°**

| | pH 6,0 | | pH 6,5 | | pH 7,0 | | pH 7,5 | | pH 8,0 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle |
| Sofort ..... | 0,084 | — | 0,081 | — | 0,075 | — | 0,084 | — | 0,084 | — |
| Nach 24 Stunden ..... | 0,336 | + 0,252<br>+ 300 % | 0,36 | + 0,276<br>+ 345 % | 0,66 | + 0,585<br>+ 780 % | 0,59 | + 0,506<br>+ 602 % | 0,60 | + 0,516<br>+ 614 % |
| Nach 48 Stunden ..... | 0,52 | + 0,436<br>+ 770 % | 0,48 | + 0,399<br>+ 492 % | 0,54 | + 0,465<br>+ 620 % | 0,71 | + 0,626<br>+ 745 % | 0,76 | + 0,676<br>+ 804 % |
| Nach 72 Stunden ..... | 0,56 | + 0,476<br>+ 566 % | 0,43 | + 0,349<br>+ 430 % | 0,75 | + 0,675<br>+ 900 % | 0,73 | + 0,646<br>+ 769 % | 0,82 | + 0,736<br>+ 876 % |
| Nach 96 Stunden ..... | 0,31 | + 0,226<br>+ 269 % | 0,47 | + 0,386<br>+ 476 % | 0,68 | + 0,605<br>+ 806 % | 0,75 | + 0,666<br>+ 792 % | 1,12 | + 1,036<br>+ 1233 % |
| Nach 120 Stunden ..... | 0,36 | + 0,276<br>+ 320 % | 0,40 | + 0,319<br>+ 393 % | 0,67 | + 0,595<br>+ 793 % | 0,82 | + 0,776<br>+ 876 % | — | — |

## Tabelle V: Phosphatserie. Coli. Versuch mit verschiedenen pH.

**Mol. $^1/_{30}$ bei 37°**

| | pH 6,0 | | pH 6,5 | | pH 7 | | pH 7,5 | | pH 8,0 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle |
| Sofort ..... | 0,084 | — | 0,028 | - | 0,056 | - | 0,056 | — | 0,056 | - |
| Nach 24 Stunden ..... | 0,16 | + 0,076<br>+ 90% | 0,14 | + 0,112<br>+ 400% | 0,16 | + 0,104<br>+ 185% | 0,28 | + 0,224<br>+ 400% | 0,30 | + 0,244<br>+ 435% |
| Nach 48 Stunden ..... | 0,23 | + 0,146<br>+ 173% | 0,14 | + 0,112<br>+ 400% | 0,19 | + 0,134<br>+ 239% | 0,35 | + 0,294<br>+ 525% | 0,42 | + 0,364<br>+ 650% |
| Nach 72 Stunden ..... | 0,39 | + 0,306<br>+ 361% | 0,22 | + 0,136<br>+ 485% | 0,25 | + 0,194<br>+ 346% | 0,30 | + 0,244<br>+ 435% | 0,43 | + 0,374<br>+ 667% |
| Nach 96 Stunden ..... | 0,46 | + 0,376<br>+ 447% | 0,25 | + 0,222<br>+ 757% | 0,29 | + 0,234<br>+ 417% | 0,40 | + 0,344<br>+ 614% | 0,54 | + 0,484<br>+ 864% |
| Nach 120 Stunden ..... | 0,44 | + 0,356<br>+ 423% | 0,35 | + 0,322<br>+ 1157% | 0,25 | + 0,194<br>+ 350% | 0,33 | + 0,274<br>+ 489% | — | — |

nicht regelmäßig nach einer bestimmten Bebrütungszeit eingetreten war. Das Wesentliche war jedoch, daß ein absolutes Maximum der Autolysen N-Vermehrung stets bei einem pH 8,0 beobachtet wurde. Die Autolyse schritt hier von Tag zu Tag gleichmäßig voran. Die N-Vermehrung im Laufe der Bebrütungszeit war außerdem auch noch deutlich bei einem zH 7,0 bis 7,5.

Bei den Phosphatversuchen mit Coli-Kulturen wurden ähnliche Regeln beobachtet (Tabelle V): im allgemeinen war die N-Vermehrung nicht so intensiv, wie bei Proteus, aber doch gut meßbar und manchmal bedeutend. Es nahm die Autolyse-N-Menge bei allen geprüften Bebrütungszeiten bei einem pH 6,5, 7,5 und 8,0 zu. Relativ am größten war sie bei pH 6,5 nach 120 Stunden (die 120stündige N-Menge bei 8,0 fehlt uns leider aus technischen Gründen). Ebenso, wie bei den Proteusversuchen lag das absolute Maximum bei pH 8,0. Bei pH 7,5 fing die Vermehrung nach 24 Stunden an. Dann trat nach 72 Stunden eine Hemmung ein. Nach 96 Stunden trat dann eine erneute N-Vermehrung auf, die nach 120 Stunden wieder in einer Hemmung endete. Demnach ist die N-Menge bei pH 7,5 ungleich bei den verschiedenen Bebrütungszeiten. Bei pH 7,0 geht die Vermehrung regelmäßig bis zu 96 Stunden weiter. Erst nach 120 Stunden tritt eine Hemmung ein. Auf die Erklärung dieser Phänomene wird erst weiter unten eingegangen werden.

Bei pH 6,5 geht die Vermehrung regelmäßig bis zu 120 Stunden, wie auch bei pH 6,0. Die geringste N-Menge im Vergleich mit allen anderen pH ist bei 7,0 beobachtet worden und die größte bei pH 8,0. Die N-Vermehrung ging hier nicht parallel mit der pH-Vermehrung. Es trat vielmehr eine Erhöhung bei pH 6,5 und dann wieder eine Verminderung bei pH 7,0 ein. Schließlich haben wir eine neue Erhöhung der N-Menge bei pH 7,5 und 8,0 beobachtet, welche Erhöhung aber immer noch kleiner bei pH 7,5 und größer bei 6,5 und am größten bei 8,0 bleibt.

Beim Vergleich der beiden Serien, d. h. der Proteus- und Coliversuche, ist folgendes hervorzuheben. Die N-Vermehrung, bzw. die Autolyse ist bei Proteus stärker als bei Coli. Die Autolyse schritt nicht parallel den verschiedenen Bebrütungszeiten vor. Das Maximum der Autolyse lag zwischen 72 bis 96 und nicht immer bei 120 Stunden. Das Wesentlichste von allem war, daß bei beiden Serien das absolute Maximum der Autolyse bei einem pH 8,0 gefunden wurde.

Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig mit der N-Bestimmung bei jedem pH nach jeder Bebrütungszeit auch die Bakterienzahl mit der Methodik festgestellt, die von T. Wohlfeil an anderer Stelle beschrieben worden ist. Doch soll über ihre Ergebnisse erst später zusammenfassend berichtet werden.

KAPITEL III.

# DIE ABHÄNGIGKEIT DER AUTOLYSE VON DER BAKTERIENMENGE

Im Anschluß an die Phosphat-pH-Versuche habe ich mir die Frage vorgelegt, inwiefern die Quantität der in der Suspension vorhandenen Bakterien eine Rolle bei der Autolysen-N-Vermehrung spielt und inwieweit die Reaktionsgeschwindigkeit der bakteriellen Autolyse durch die verschiedenen Bakterienquantitäten beeinflußt wird. Diese Versuche wurden folgenderweise ausgeführt: Von der Phosphatpufferlösung (sekundäres Natrium und primäres Kaliumphosphat) nach Sörensen hergestellt, wurde eine pH-Pufferlösung mit pH 7,5 hergestellt und zwar wieder 1/30 molar, um ein isotonisches Milieu zu haben. Dann habe ich verschiedene Mengen von Proteus-Kulturen abgewogen, und zwar in folgender geometrischer Reihe (Tabelle VI): 0,75 g, 1,5 g, 3 g, 6 g in je einem Becherglas und diese ansteigende Menge in je 150 ccm Phosphatpufferlösung pH 7,5 aufgeschwemmt. Jede Aufschwemmung wurde nachher sehr gut geschüttelt, damit nach der Abfüllung auf die Versuchsgefäße nicht ungleiche Kulturmengen in den Röhrchen vorhanden waren. Jede Aufschwemmung wurde auf 5 Röhrchen, die vorher chemisch gereinigt und getrocknet wurden, verteilt

**Tabelle VI: Phosphatserie. Proteus**

**pH 7,5**

| | 0,75 g Kultur | | | 1,5 g | |
|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle |
| Sofort | 0,028 | — | 33 600 000 000 | 0,014 | — |
| Nach 24 Stunden | 0,16 | + 0,132<br>+ 472% | 28 400 000 000<br>— 14,8% | 0,42 | + 0,406<br>+ 2900% |
| Nach 48 Stunden | 0,18 | + 0,152<br>+ 542% | 25 600 000 000<br>— 23,8% | 0,51 | + 0,496<br>+ 3542% |
| Nach 72 Stunden | 0,30 | + 0,272<br>+ 972% | 2 080 000 000<br>— 66,1% | 0,54 | + 0,526<br>+ 3757% |
| Nach 96 Stunden | 0,16 | + 0,132<br>+ 472% | 33 600 000 000<br>— | 0,51 | + 0,496<br>+ 3542% |
| Nach 120 Stunden | 0,28 | + 0,252<br>+ 900% | 27 200 000 000<br>— 16,0% | 0,67 | + 0,656<br>+ 4685% |

und ein Teil von jeder Serie zur sofortigen Bestimmung des gelösten N zurückbehalten. Die Veraschung und die Destillation wurde schon oben geschildert. Gleichzeitig habe ich von jeder Serie eine Bakterienzählung vorgenommen.

Dieser Proteus-Versuch zeitigte folgende Ergebnisse. Die Stickstoffvermehrung hatte bei der 0,75-g-Serie nach 24stündiger Bebrütungszeit angefangen und sich bis zu 72stündiger Bebrütungszeit fortgesetzt. Nach 96stündiger Bebrütung hat sich der N-Wert vermindert und nach 120 Stunden dann wieder vermehrt. Das Maximum der ganzen 0,75-g-Serie lag aber bei 72 Stunden.

Bei der 1,5-g-Serie wurde folgendes beobachtet: Die Autolysen-N-Vermehrung blieb bis zu 72stündiger Bebrütung fast gleich, verminderte sich nach 96 Stunden, um sich dann nach 120 Stunden wieder zu vermehren. Die Bakterienzahl hat sich dann nach 72 Stunden entsprechend vermindert, nach 48stündiger Bebrütung war die Verminderung aber bedeutender als nach 24stündiger Bebrütung. Nach 96 Stunden wurde dann eine Vermehrung beobachtet, die später nach 120 Stunden wieder in eine Verminderung überging. Bei der 3-g-Serie war meine Beobachtung folgende: Die Vermehrung des Autolysen-N war bis zu 72stündiger Bebrütung geringer, nach 96 Stunden stellte ich dann wieder eine Vermehrung fest bis zu 120 Stunden. Die Verminderung der Bakterien hatte bis 72 Stunden gedauert; alsdann trat nach 96 Stunden wieder eine geringere Vermehrung ein. Nach 120 Stunden beobachtete ich eine neue und starke Verminderung.

**in verschiedenen Bakterienmengen**

**Mol. $^1/_{30}$ bei 37°**

| Kultur | 3,0 g Kultur | | | 6,0 g Kultur | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| 354 200 000 000 | 0,014 | — | 388 800 000 000 | 0,014 | — | 6 091 200 000 000 |
| 113 600 000 000 — 67,8 % | 0,82 | + 0,806 + 5757 % | 176 000 000 000 — 54,8 % | 1,03 | + 1,016 + 7257 % | 464 000 000 000 — 92,3 % |
| 65 600 000 000 — 81,5 % | 0,96 | + 0,946 + 6756 % | 655 200 000 000 + 68,5 % | 1,93 | + 1,916 + 13685 % | 291 200 000 000 — 98,5 % |
| 81 600 000 000 — 77 % | 0,95 | + 0,936 + 6685 % | 153 600 000 000 — 60,4 % | 1,83 | + 1,816 + 12971 % | 272 000 000 000 — 95,5 % |
| 115 200 000 000 — 67,5 % | 1,10 | + 1,086 + 7757 % | 177 600 000 000 — 51,7 % | 2,10 | + 2,086 + 14900 % | 320 000 000 000 — 94,7 % |
| 78 400 000 000 — 77,9 % | 1,13 | + 1,116 + 7971 % | 142 400 000 000 — 63,3 % | 2,59 | + 2,576 + 18114 % | 210 200 000 000 — 96,5 % |

Bei der 6-g-Serie waren die Ergebnisse folgende: Die Vermehrung des Autolysen-N schritt bis zu 48 Stunden vor. Nach 72 Stunden trat eine geringe Verminderung ein, und von 96 Stunden an hatte ich wieder eine Vermehrung bis zu 120 Stunden beobachtet. Die Bakterienzahl hatte sich in entsprechender Weise vermindert, nur mit dem Unterschied, daß man eine Vermehrung nach 96 Stunden beobachten konnte und nach 120 Stunden dann wieder eine Verminderung.

Aus den Beobachtungen all dieser Serien ist zu schließen, erstens, daß die größte N-Vermehrung des Autolysen-N bei 6,0 g Bakterienmasse in 150 ccm Suspension erfolgte. Es folgt die bei 3 g, 1,5 g und 0,75 g. Die Vermehrung der Autolyse wies ungefähr dieselbe Reihenfolge auf, wie die entsprechenden Mengen der Kulturen.

Im Durchschnitt aller Versuchstage verhielten sich die Autolysen-N-Werte zu den Bakterienmengen in 150 ccm wie folgt: 0,19 g N/0,75 g Bakterienmasse; 0,51 mg N/1,5 g Bakterienmasse; 0,98 mg N/3,0 g Bakterienmasse; 1,08 mg N/6,0 g Bakterienmasse. Wenn die Bakterienmengen in der Suspension im Verhältnis 1 : 2, 4 : 8 anstiegen, waren in diesen Versuchen die Autolysen-N-Menge im Verhältnis 1 : 2, 7 : 5, 2 : 10 vermehrt. Die Autolyse nimmt mit steigender Konzentration der Bakterienmenge anscheinend etwas stärker zu, als es der Konzentrationsvermehrung der Bakterien entsprechen würde. In dichten Bakteriensuspensionen scheint demnach die Autolyse etwas kräftiger vorzuschreiten, als in relativ dünnen Suspensionen. (Tabelle 7.)

**Tabelle VII: Phosphatserie. Coli**

**pH 7,5**

| | 0,75 g Kultur | | | 1,5 g | |
|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle |
| Sofort | 0,028 | — | 519 400 000 000 | 0,028 | — |
| Nach 24 Stunden | 0,196 | + 0,168<br>+ 585 % | 158 000 000 000<br>— 69,5 % | — | — |
| Nach 48 Stunden | 0,224 | + 0,196<br>+ 700 % | 68 800 000 000<br>— 86,7 % | 0,392 | + 0,364<br>+ 1300 % |
| Nach 72 Stunden | 0,280 | + 0,252<br>+ 900 % | 92 800 000 000<br>— 82,1 % | 0,812 | + 0,784<br>+ 2800 % |
| Nach 96 Stunden | 0,308 | + 0,280<br>+ 1000 % | 140 800 000 000<br>— 72,9 % | 0,448 | + 0,420<br>+ 1500 % |
| Nach 120 Stunden | 0,266 | + 0,238<br>+ 850 % | 137 600 000 000<br>— 73,5 % | 0,522 | + 0,494<br>+ 1764 % |

Bei unserer Coliserie, die wir zu demselben Zweck ausgeführt haben, hatten wir Ähnliches gefunden. Die Serie war unter denselben technischen Bedingungen ausgeführt, wie die Proteusserie. Eine nochmalige genaue Beschreibung der einzelnen N-Vermehrung und Bakterienverdünnungen kann daher unterlassen werden. Es ist nur hervorzuheben, daß bei der 0,75-g-Serie irgendein Wägefehler eingetreten sein mußte, da die mikroskopisch gezählten Bakterienzahlen im Verhältnis zu den übrigen Bakterienmassen sehr hoch gefunden wurden. Nach dieser Einschränkung kann gesagt werden, daß die Versuche sämtlicher Serien im Vergleich untereinander folgende Resultate ergeben haben: Die N-Vermehrung war wieder bei der 6-g-Serie am stärksten und hatte ihr Maximum schon bei 48 Stunden erreicht, aber die N-Mengen waren in allen Bebrütungszeiten sehr bedeutend.

Bei der 3-g-Serie war die N-Vermehrung auch sehr groß, aber immer noch geringer im Vergleich mit der Vermehrung, die wir bei 6 g beobachteten. Die Vermehrung hatte hier ihr Maximum erst nach 72stündiger Bebrütungszeit gehabt und dann wieder nach 120 Stunden eine Vermehrung.

Bei 1,5 g war das Maximum nach 72 Stunden erreicht, wie bei der 3-g-Serie und bei 0,75 war das Maximum erst nach 96 Stunden eingetreten. Man kann daraus also schließen, daß zwischen Autolysen-Stickstoffvermehrung-Bebrütungszeit und Bakterienmenge eine deutliche Beziehung besteht. Je größer die Bakterienmenge in der Sus-

**in verschiedenen Bakterienmengen**

**Mol. $^1/_{30}$ bei 37°**

| Kultur | 3,0 g Kultur | | | 6,0 g Kultur | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| 364 800 000 000 | 0,028 | — | 556 800 000 000 | 0,028 | — | 609 600 000 000 |
| 249 600 000 000 — 31,5 % | 0,54 | + 0,512 + 1828 % | 352 200 000 000 — 31,6 % | 1,300 | + 1272 + 4542 % | 480 000 000 000 — 21,2 % |
| 176 000 000 000 — 51,6 % | 0,700 | + 0,722 + 2757 % | 312 000 000 000 — 43,9 % | 2,910 | + 2882 + 10292 % | 475 200 000 000 — 22 % |
| 139 200 000 000 — 61,8 % | 0,924 | + 0,896 + 3200 % | 182 000 000 000 — 67,1 % | 2.254 | + 2226 + 7914 % | 198 600 000 000 — 67,4 % |
| 223 200 000 000 — 38,8 % | 0,322 | + 0,294 + 1050 % | 312 000 000 000 — 43,8 % | 1,540 | + 1512 + 5400 % | 417 600 000 000 — 31,5 % |
| 201 600 000 000 — 44,7 % | 0,952 | + 0,924 + 3300 % | 324 000 000 000 — 41,7 % | 1,960 | + 1932 + 6900 % | 403 200 000 000 — 33,8 % |

pension ist, um so schneller wird das Maximum der Autolyse erreicht. Andererseits findet sich auch in der Coliserie, wenn auch nicht so mathematisch ausgeprägt, jene Regel, daß die Autolysenmengen ungefähr im gleichen Verhältnis zunehmen, wie die Menge der anfangs in die Suspension gegebenen Bakterien zugenommen haben.

KAPITEL IV.

## BEDEUTUNG DER BEBRÜTUNGSTEMPERATUREN FÜR DIE BAKTERIEN-AUTOLYSE

Weitere Versuche hatten den Zweck, Beobachtungen über die Bedeutung der Temperatur für die Bakterienautolyse zu sammeln und festzustellen, welche Temperatur die Autolyse am meisten begünstigt bzw. welche Wirkung sie auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Autolyse ausübt.

Alle Enzyme besitzen bekanntlich nur eine geringe Hitzebeständigkeit. Bis jetzt ist bekannt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von Fermenten durch eine Temperaturerhöhung um $10^0$ meist ungefähr um das Doppelte gesteigert wird. Jedoch gilt das nur innerhalb gewisser Grenzen. Bei Temperaturen von $40^0$ und darüber werden viele Fermente schon irreversibel geschädigt, ja sogar die meisten Fermente, wie schon oben erwähnt, bei Temperaturen zwischen $50^0$ unr $60^0$ völlig unwirksam gemacht. Wir müssen auch erwähnen, daß gereinigte Enzyme im allgemeinen weit thermolabiler sind als ungereinigte Präparate. Die colloiden Begleitstoffe der ungereinigten Präparate vermögen die Enzyme vor der Hydrolise, der Unterlagerung usw. in hohem Maße zu schützen. Es ist auch möglich, daß die Hitzeaktivierung wenigstens teilweise auf eine pH-Veränderung zurückgeführt werden muß, denn die Wasserstoffionenkonzentration erhöht sich wegen der Änderung der Dissociation des angewandten Puffers mit der Temperatur. Ebenso spielt die Dauer des Erhitzens eine Rolle. Im allgemeinen aber ist ein scharf begrenzter optimaler Temperaturpunkt bei der Wirkung der verschiedenen Fermentpräparate nicht vorhanden, da die bisherigen Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten immer entsprechend der Versuchsdauer, der Säurestufe und vor allem dem Reinheitsgrad der angewandten Enzymlösungen, verschieden ausgefallen sind.

Die Ausführung der Temperaturversuche ging folgendermaßen vor sich: Es wurden je 3 g Proteuskulturen für jede Serie abgewogen und 5 Serien ($4^0$, $20^0$, $37^0$, $45^0$ und $60^0$) hergestellt. Die Kulturmenge war wieder in 150 ccm Pufferphosphatlösung pH 7,5 aufgeschwemmt.

Die übrige Versuchsanordnung entsprach jener der früheren Anwendungen, so daß auf das vorhergehende Kapitel Methodik verwiesen werden kann.

Die $4^0$-Serie war im Eisschrank aufgehoben. Die $20^0$-Serie war bei Zimmertemperatur gelassen. Die $37^0$-, $45^0$- und die $60^0$-Serien in entsprechenden Brutschränken. Bei allen diesen Versuchen haben wir für das Zentrifugieren anstatt Röhrchen aus Glas, Röhrchen aus Kruppschen V2A-Stahl benutzt. Auf die Gründe, Metallgefäße statt Glasgefäße zu verwenden, haben wir eingangs schon hingewiesen. Sterilisation und Reinigen der Metallgefäße wurden in folgender Weise ausgeführt: Nach dem Gebrauch wurden sie mindestens 2 Stunden lang in 2%ige Zephyrollösung gelegt, dann mit einer sauberen Bürste öfters in reinem Wasser gewaschen, mit bidest. Wasser dreimal gespült und anschließend im $45^0$ Trockenschrank getrocknet.

Wir haben nie durch diese Metallröhrchen aus praktisch unangreifbarem Metall Veränderungen der Werte beobachtet und können sie, entsprechend den Erfahrungen Maschmanns, gleichfalls für derartige präparative Arbeiten im Gebiet der Fermentchemie sehr empfehlen.

Die Ergebnisse der Versuche waren folgende (s. Tabelle VIII):

Bei Proteuskulturen nach Aufbewahrung bei $4^0$ ergab sich nur eine sehr geringe N-Vermehrung. Die Bakterienzahl war sehr wenig vermindert. Nach 24 Stunden war die Zahl sogar größer als die Kontrolle, was darauf zurückgeführt werden kann, daß die bei Versuchsanfang gerade im Beginn des Teilungsstadiums befindlichen Stäbchen in der Phosphatlösung auseinanderfielen. Die N-Vermehrung war unregelmäßig und geringgradig. Bei $20^0$ Bebrütungstemperatur fanden wir bereits eine wesentlich stärkere N-Vermehrung als bei $4^0$. Am stärksten war sie hier nach 48stündiger Bebrütung. Dann trat eine Verminderung nach 72 Stunden ein, die weiter ging bis 96 Stunden, anschließend kam eine neue Vermehrung nach 120 Stunden, die die gleiche Größe besaß wie bei 72stündiger Bebrütung. Die Bakterienzahl verhielt sich entsprechend der Ab- und Zunahme der Stickstoffmenge, jedoch ließ sich vorwiegend bereits eine Abnahme beobachten. Bei allen Serien aber fehlt uns leider aus technischen Gründen die Bakterienzahl nach 120 Stunden.

Bei $37^0$ Bebrütung konnte man eine starke N-Vermehrung schon bei 24 Stunden feststellen, die bis 72 Stunden weiterging, zu welchem Zeitpunkt sie am stärksten war. Anschließend war eine Verminderung bis zu 96 Stunden und dann wieder eine geringe Vermehrung nach 120 Stunden zu beobachten. Die Bakterienzahl veränderte sich entsprechend der Ab- und Zunahme der Autolyse-N-

**Tabelle VIII: Phosphatserie**
**Autolyse unter verschiedenen**

| bei | 4° | | | 20° | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| Sofort | 0,014 | — | 368 000 000 000 | 0,028 | — | 444 000 000 000 |
| Nach 24 Stunden | 0,042 | +0,028 + 200% | 448 000 000 000 + 21,7% | 0,098 | +0,070 + 250% | 332 800 000 000 — 25,2% |
| Nach 48 Stunden | 0,224 | +0,200 + 1500% | 345 600 000 000 — 22,7% | 0,392 | +0,364 + 1400% | 312 000 000 000 — 29,7% |
| Nach 72 Stunden | 0,070 | +0,056 + 400% | 368 000 000 000 — 17,5% | 0,224 | +0,196 + 700% | 352 000 000 000 — 20,7% |
| Nach 96 Stunden | 0,196 | +0,182 + 1300% | 313 600 000 000 — 30% | 0,084 | +0,056 + 200% | 323 200 000 000 — 27,2% |
| Nach 120 Stunden | 0,070 | +0,056 + 400% | — | 0,224 | +0,196 + 700% | — |

Vermehrung. Bei 45° Bebrütung konnte man eine stetige Vermehrung des Autolysen-N bis zu 72 Stunden feststellen, wo sie am stärksten war. Nach 96 Stunden wieder eine Verminderung, dann eine Vermehrung nach 120 Stunden. Die Bakterienzahl hatte eine Ab- und Zunahme, entsprechend der Ab- und Zunahme des Autolysen-N.

**Tabelle IX. Phosphatserie.**
**Autolyse unter verschiedenen**

| bei | 4° | | | 20° | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| Sofort | 0,056 | — | 400 000 000 000 | 0,056 | — | 400 000 000 000 |
| Nach 24 Stunden | 0,084 | +0,028 + 50% | 384 000 000 000 — 4% | 0,182 | +0,126 + 225% | 336 000 000 000 — 16% |
| Nach 48 Stunden | 0,095 | +0,039 + 69,6% | 412 000 000 000 + 3% | 0,182 | +0,126 + 225% | 456 000 000 000 + 14% |
| Nach 72 Stunden | 0,098 | +0,042 + 75% | 448 000 000 000 + 12% | 0,124 | +0,068 + 121% | 312 000 000 000 — 22% |
| Nach 96 Stunden | 0,070 | +0,014 + 25% | 456 000 000 000 + 16% | 0,224 | +0,168 + 300% | 268 000 000 000 — 33% |
| Nach 120 Stunden | 0,126 | +0,070 + 125% | 456 000 000 000 + 16% | 0,182 | +0,168 + 225% | 358 000 000 000 — 10,5% |

**pH 7,5. Mol. $^1/_{30}$**

**Temperaturen — Proteus**

| 37° | | | 45° | | | 52° | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| 0,084 | — | 412 000 000 000 | 0,042 | — | 352 000 000 000 | 0,042 | — | 404 000 000 000 |
| 0,616 | +0,532<br>+6,333 % | 382 000 000 000<br>— 7,2 % | 0,630 | +0,588<br>+ 1400 % | 266 400 000 000<br>— 24,3 % | 0,756 | +0,714<br>+ 1700 % | 271 200 000 000<br>— 32,8 % |
| 0,770 | +0,686<br>+ 816 % | 379 200 000 000<br>— 7,9 % | 1,008 | +0,996<br>+ 2300 % | 204 800 000 000<br>— 41,8 % | 0,514 | +0,462<br>+ 1100 % | 204 800 000 000<br>— 49,2 % |
| 1,148 | +1,060<br>+ 1261 % | 249 600 000 000<br>— 39 % | 2,170 | +2,128<br>+ 5066 % | 211 800 000 000<br>— 39,8 % | 0,980 | +0,938<br>+ 2233 % | 313 600 000 000<br>— 22,3 % |
| 0,952 | +0,868<br>+ 1033 % | 423 400 000 000<br>+ 26,6 % | 0,980 | +0,588<br>+ 2333 % | 281 600 000 000<br>— 20 % | 1,120 | +1,078<br>+ 2566 % | 371 200 000 000<br>— 8,1 % |
| 0,994 | +0,910<br>+ 1080 % | — | 1,134 | +1,092<br>+ 2595 % | — | 0,966 | +0,924<br>+ 2200 % | — |

Auch bei der 60°-Serie ließen sich ähnliche Beobachtungen, d. h. Verminderungen und Vermehrungen des Autolysen-N und ein dementsprechendes Verhalten der Bakterienzahlen feststellen. Im allgemeinen war hier jedoch die Autolyse wieder wesentlich schwächer als nach Bebrütung bei 45°.

**Coli. pH 7,5 Mol. $^1/_{30}$**

**Temperaturen**

| 37° | | | 45° | | | 52° | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| 0,056 | — | 548 000 000 000 | 0,052 | — | 384 000 000 000 | 0,084 | — | 400 000 000 000 |
| 0,924 | +0,868<br>+ 1550 % | 328 000 000 000<br>— 43,7 % | 1,05 | +0,998<br>+ 1919 % | 288 000 000 000<br>— 27,6 % | 0,588 | +0,504<br>+ 600 % | 268 000 000 000<br>— 33 % |
| 0,756 | +0,700<br>+ 1250 % | 300 000 000 000<br>— 45,2 % | 0,812 | +0,760<br>+ 1461 % | 348 000 000 000<br>— 9,3 % | 0,812 | +0,738<br>+ 879 % | 342 000 000 000<br>— 14,5 % |
| 0,980 | +0,924<br>+ 1650 % | 294 000 000 000<br>— 46,3 % | 1,148 | +1,096<br>+ 2107 % | 212 000 000 000<br>— 44,7 % | 0,868 | +0,784<br>+ 933 % | 392 000 000 000<br>— 2 % |
| 0,994 | +0,938<br>+ 1635 % | 281 000 000 000<br>— 48,7 % | 0,896 | +0,844<br>+ 1623 % | 236 000 000 000<br>— 38,5 % | 1,316 | +1,232<br>+ 1465 % | 384 000 000 000<br>— 4 % |
| 0,924 | +0,868<br>+ 1550 % | — | 1,008 | +0,956<br>+ 1838 % | 312 000 000 000<br>— 18,6 % | 1,036 | +0,952<br>+ 1133 % | — |

Zusammenfassend betrachtet, ergab sich, daß die Autolyse bei 45° Temperatur und die Bakterienabnahme ebenso bei 45° am stärksten war. An zweiter Stelle bezüglich der N-Vermehrung kam dann die 60° Bebrütung, wo auch die zweitstärkste Abnahme der Bakterienzahl eintrat. Dann folgten in der Reihenfolge die Ergebnisse bei 37°, bei 20° und endlich die bei 4°. Im Vergleich mit den anderen Temperaturen war bei der N-Vermehrung festzustellen, daß die Vermehrung bei 20° Temperatur nach 48 Stunden am stärksten war, während bei 37° und 45° die stärkste N-Vermehrung erst nach 72stündiger Bebrütungszeit einsetzte.

Bei dem Coliversuch haben wir prinzipiell ähnliche Daten erzielt. Der Versuch war in gleicher Weise wie bei Proteus ausgeführt worden. Einzelheiten sind in der Tabelle IX (S. 30/31) ersichtlich. Bei Vergleich sämtlicher Coli-Temperaturserien sehen wir, daß die Autolyse wieder durchschnittlich bei 45° am größten war. Bei 37° und 60° Bebrütung wie auch bei 20° trat eine stärkere Autolyse erst später ein, und zwar bei allen 3 Serien nach 96stündiger Bebrütungszeit. Das absolute Maximum der N-Vermehrung liegt also bei 45° Temperatur. An zweiter Stelle kommt die Bebrütungstemperatur von 37° und dann bei 60°. Bei 20° und 4° ist die Autolyse kleiner, und zwar ist sie am geringsten bei 4°.

Bei Vergleich der beiden Tabellen Proteus und Coli ist folgendes festzustellen: Bei beiden Bakterien begünstigt die Bebrütungszeit von 45° Temperatur ihre Autolyse am meisten, während bei Bakterien Coli an zweiter Stelle für die Begünstigung der Autolyse die 37° Temperatur kommt. Bei Proteus aber kommt die Temperatur von 60° an zweiter Stelle.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Autolyse bei Bakterium Proteus stärker als bei Bakterium Coli ist. Besonders bei 4° hat Bakterium Proteus schon einen wesentlich stärkeren Anteil autolysierter Bakterien aufzuweisen als Bakterium Coli. Umgekehrt ist die Steigerung der Autolyse bei Temperaturerhöhung von 4° bei Bakterium Coli stärker ausgeprägt als bei Bakterium Proteus. Bei beiden aber besteht eine starke Abhängigkeit von der Temperatur insofern, als Temperaturen bis 45° die Autolyse andauernd verstärken. Bei Temperaturen über 45° tritt dann wieder eine Abnahme der Autolyse ein.

Die Verschiedenheit der Autolysengeschwindigkeit von Bakterium Coli und Bakterium Proteus bei den verschiedenen Temperaturen könnte man sich vielleicht so erklären, daß die Zellstruktur der beiden Bakterienarten verschieden ist. Unter der Voraussetzung, daß die Autolyse durch die zelleigenen, eiweißabbauenden Fermente zustande kommt, könnte man ferner annehmen, daß die Verankerung

des Fermentkomplexes bei jedem Bakterium verschieden ist und demnach auch die aktive Gruppe oder der kolloidale Träger oder beide für jede Bakterienart wahrscheinlich Gruppenspezifität zeigen, die bei verschiedenen Bakterien verschieden sein muß. Jedoch sind letzteres nur Hypothesen. Abschließend ist zu bemerken, daß auch die Ergebnisse der direkten Bakterienzählung die obigen chemischen Resultate ergänzt und bestätigt haben. Jede Zunahme des Autolysen-N äußerte sich meist in einer Abnahme der Bakterienzahl. Wenn nach mehrtägiger Bebrütung gelegentlich eine erneute Zunahme der Bakterienzahlen mit einer Abnahme des Autolysen-N zu beobachten war, so halten wir dieses auf Grund der zahlreichen Beobachtungen für den Ausdruck einer erneuten Bakterienvermehrung. Es scheint so zu sein, daß der innerhalb der ersten Tage freigewordene Stickstoff der autolysierten Bakterien von den übriggebliebenen lebenden Mikroben unter bestimmten Umständen wieder als Nahrungsquelle Verwendung findet. Solche Schwankungen der Bakterienzahlen sind ja auch von Versuchen anderer Autoren her bekannt (Gottschlich).

KAPITEL V.

## BEDEUTUNG DES OSMOTISCHEN DRUCKES IN DEN AUFSCHWEMMUNGSMEDIEN FÜR DIE GRÖSSE DER BAKTERIENAUTOLYSE

Die neue Versuchserie hatte den Zweck zu beobachten, welche Rolle der osmotische Druck des Milieus bei der Bakterienautolyse spielte. Im besonderen sollte festgestellt werden, ob bei Isotonie der Verlauf der Autolyse am besten vor sich ging, entsprechend den Gesetzen der Permeabilität der Zelle (Hoeber), oder ob eine Autolyse am stärksten erst nach Plasmolyse der Bakterienzellen bei hypotonischem Milieu stattfand. Diese Versuche wurden folgenderweise ausgeführt: 2 g Bakterienmenge wurden wieder mit 150 ccm Phosphatpufferlösung aufgeschwemmt. Die Phosphatpufferlösung mit verschiedenen Molaritäten waren aus dem Puffergemisch der Originalpufferlösungen nach Soerensen hergestellt worden. Die Vorbereitung der Röhrchen für jede Bebrütungszeit, wie auch die Kontrollen, d. h. die sofortige Bestimmung erfolgte unter denselben Bedingungen, wie schon oben bei den anderen Versuchen beschrieben worden ist.

Die Resultate waren folgende (Tabelle X): Bei mol. 1/15 Lösungen hatte die Stickstoffvermehrung schon nach 24 Stunden angefangen.

## Tabelle X: Protens. Versuch mit verschiedenen osmotischen Drucken.

**Phosphatpufferlösung in verschiedenen Molaritäten. pH 7,5 bei 37°**

| In 3 g Kultur | Mol. $^1/_{15}$ | | | Mol. $^1/_{30}$ | | | Mol. $^1/_{60}$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| Sofort ..... | 0,028 | — | 344 000 000 000 | 0,042 | — | 496 000 000 000 | 0,042 | — | 416 000 000 000 |
| Nach 24 Stunden ... | 0,686 | + 0,658<br>+ 2350 % | 368 000 000 000<br>+ 6,3 % | 0,789 | + 0,747<br>+ 1776 % | 368 000 000 000<br>— 25,8 % | 0,882 | + 0,840<br>+ 2000 % | 372 000 000 000<br>— 10,5 % |
| Nach 48 Stunden ... | 0,840 | + 0,812<br>+ 3000 % | 319 200 000 000<br>— 7,2 % | 0,882 | + 0,840<br>+ 2000 % | 256 800 000 000<br>— 48,2 % | 1,008 | + 0,966<br>+ 2300 % | 187 200 000 000<br>— 55 % |
| Nach 72 Stunden ... | 1,022 | + 0,994<br>+ 3550 % | 248 000 000 000<br>— 27,9 % | 1,022 | + 0,980<br>+ 2330 % | 222 400 000 000<br>— 55,1 % | 1,190 | + 1,148<br>+ 2723 % | 212 800 000 000<br>— 48,7 % |
| Nach 96 Stunden ... | 0,952 | + 0,924<br>+ 3300 % | 395 200 000 000<br>+ 14,3 % | 1,190 | + 1,148<br>+ 2733 % | 194 200 000 000<br>— 64,6 % | 1,246 | + 1,204<br>+ 2866 % | 153 600 000 000<br>— 63,1 % |
| Nach 120 Stunden ... | 1,162 | + 1,134<br>+ 4050 % | 220 800 000 000<br>— 35,8 % | 1,148 | + 1,106<br>+ 2619 % | 392 800 000 000<br>— 21 % | 1,227 | + 1,185<br>+ 2821 % | 192 000 000 000<br>— 56,2 % |

## Tabelle XI: Cali. Versuch mit verschiedenen osmotischen Drucken

**Phosphatpufferlösung mit verschiedenen Molaritäten. pH 7,5 bei 37°**

| 3 g Bakterienkultur | Mol. $^1/_{15}$ | | | Mol. $^1/_{30}$ | | | Mol. $^1/_{60}$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung g egen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| Sofort ..... | 0,056 | — | 428 000 000 000 | 0,028 | | 404 000 000 000 | 0,042 | — | 400 000 000 000 |
| Nach 24 Stunden ... | 0,56 | + 0,504<br>+ 900 % | 332 000 000 000<br>— 22,8 % | 0,60 | + 0,572<br>+ 2042 % | 358 000 000 000<br>— 11,3 % | 0,57 | + 0,528<br>+ 1257 % | 304 000 000 000<br>— 24 % |
| Nach 48 Stunden ... | 0,92 | + 0,864<br>+ 1535 % | 346 000 000 000<br>— 18,2 % | 0,78 | + 0,752<br>+ 2721 % | 276 000 000 000<br>— 31,6 % | 0,74 | + 0,698<br>+ 1661 % | 292 000 000 000<br>— 27 % |
| Nach 72 Stunden ... | 0,98 | + 0,924<br>+ 1650 % | 196 000 000 000<br>— 53,5 % | 0,85 | + 0,822<br>+ 2935 % | 232 000 000 000<br>— 47,5 % | 0,88 | + 0,848<br>+ 2019 % | 171 000 000 000<br>57,2 % |
| Nach 96 Stunden ... | 0,96 | + 0,904<br>+ 1614 % | 212 000 000 000<br>— 50,4 % | 1,06 | + 1,032<br>+ 3685 % | 208 000 000 000<br>— 48,5 % | 0,98 | + 0,938<br>+ 2233 % | 200 000 000 000<br>— 50 % |
| Nach 120 Stunden ... | 1,08 | + 1,024<br>+ 1828 % | 180 000 000 000<br>— 57,9 % | 0,98 | + 0,952<br>+ 3400 % | 304 000 000 000<br>— 28,9 % | 1,02 | + 0,992<br>+ 2361 % | 304 000 000 000<br>— 24 % |

Sie erreichte, mit einer geringen Verminderung nach 96 Stunden, ihr Maximum nach 120 Stunden. Bei mol. 1/30 war das Maximum der Stickstoffvermehrung erst nach 96 Stunden erreicht. Weiterhin lag eine Verminderung nach 120 Stunden vor. Bei mol. 1/60 hat die Autolysen-N-Vermehrung wieder nach 24stündiger Bebrütung angefangen und war bis 96 Stunden fortgeschritten, zu welchem Zeitpunkt das Maximum der N-Vermehrung erreicht worden ist. Nach 120 Stunden setzte eine geringe Verminderung ein.

Die Bakterienzahlen zeigten demgegenüber bei mol. 1/15 eine Verminderung bis zu 72stündiger Bebrütung; dann hatten wir nach 96 Stunden wieder eine Vermehrung, welche sogar den Wert der Ausgangsbakterienmenge zu Versuchsbeginn überschritt. Nach 120 Stunden erfolgte eine neue Verminderung. Bei der mol. 1/30 Versuchsserie trat nach 24 Stunden eine Verminderung ein, die bis zu 72 Stunden weiterging. Nach 96 Stunden hatten wir noch eine bedeutende Verminderung, nach 120 Stunden wiederum eine Vermehrung. Bei mol. 1/60 beobachteten wir nach 2 Stunden eine Bakterienverminderung, welche nach 48 Stunden bedeutend war und weiterging bis zu 72 Stunden. Nach 96 Stunden ging die Verminderung bedeutend weiter bis 120 Stunden, aber die 120stündige Verminderung war geringer als die 96stündige. Nach 96 Stunden war die Verminderung am stärksten. Insgesamt kann aus den Proteusversuchen geschlossen werden, daß dem osmotischen Druck für die Autolyse in den Molaritäten 1/30 bis 1/60 mol. eine bedeutende Rolle nicht zukommt, da im allgemeinen nur geringgradige, wenig eindrucksvolle Unterschiede gefunden worden sind. Die Coliversuche (Tabelle XI), die unter denselben technischen Bedingungen ausgeführt wurden, hatten im einzelnen ein ähnliches Resultat, wie die Proteusversuche. Doch waren hier konstante Unterschiede der Ergebnisse bei den einzelnen Lösungen feststellbar. Die Autolysen-N-Vermehrung war bei isotonischen mol. 1/30 und bei hypotonischen 1/60 mol. Lösungen am stärksten. Bei hypertonischen Lösungen mol. 1/15 war die N-Vermehrung nicht so stark.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß leicht autolysierbare Bakterien, wie Bakterium Proteus, durch eine Änderung des osmotischen Druckes von 1/15 bis 1/60 Molarität nicht oder nur sehr geringgradig beeinflußt werden, während schwerer autolysierbare Mikroben, wie Bakterium Coli in hypertonischen Lösungen sicher am schwächsten autolysieren.

KAPITEL VI.

# WIRKUNG DER ANIONEN AUS DER HOFMEISTERSCHEN IONENREIHE AUF DIE AUTOLYSE

Die Durchführung der betreffenden Versuche ist nach folgenden Überlegungen durchgeführt worden. Es ist schon von der physikalischen und Kolloidchemie bekannt, daß die Fermente zu den Eiweißkörpern gehören und als solche kolloider Natur sind. Die Kolloide sind nach Graham (dem Vater der Kolloid-Chemie) in zwei große Zustandsgruppen oder Formen zu unterscheiden: die Sole und die Gele. Bei der Herstellung einer Kolloidlösung unterscheidet man die disperse Phase und das Dispersionsmittel. Je nach dem Aggregatzustand der beiden Phasen könen wir acht Möglichkeiten für kolloide Systeme unterscheiden. Von diesen verschiedenen kolloiden Systemen sind nur zwei biologisch wichtig, die Suspensionskolloide und Emulsionskolloide, wobei die Bedeutung der letztgenannten überwiegt. Je nach der Affinität zwischen disperser Phase und Dispersionsmittel unterscheiden wir die lyophoben und die lyophilen Kolloide.

Es gibt außerdem je nach der Eigenschaft der Flocken, wieder in Lösung zu gehen, reversible und irreversible oder noch bezeichnender ausgedrückt, resoluble und irresoluble Kolloide (Csigmondy). Eine besondere kolloide Form sind die Gallerten. Für die verschiedenen Eigenschaften der Kolloide ist von Bedeutung ihr physikalisch-chemisches Verhalten, wie die Brownsche Molekularbewegung, ihre optische Erscheinung (Thyndallphänomen), Farbkraft und Farbenintensität. Von größter biologischer Bedeutung ist ihre elektrische Ladung, deren Entstehung verschieden zu erklären ist, erstens dadurch, daß die Kolloide wegen ihrer feinen Verteilung in ihren Systemen eine sehr große innere Oberfläche haben und als oberflächenaktive Stoffe absortiv wirken, also durch Ionen-Adsorbtion eine elektrische Ladung annehmen. Diese früher weitgehend vertretene Anschauung, die also mehr oder weniger unspezifische Oberflächenkräfte voraussetzt, ist wohl für die Mehrzahl der Kolloide ebensowenig richtig wie für die Erklärung der Oberflächenaktivität überhaupt. Zweitens handelt es sich bei sehr vielen Kolloiden, so besonders bei den Eiweißkörpern, vielmehr um echte Dissoziationen. Es wird ein positiv oder negativ geladenes Ion abdissoziiert, daß in die Lösung übertritt. Das Kolloid wird dadurch zum Kolloid-Elektrolyt, bildet also echte Ionen, allerdins von erheblichen Dimensionen. Eine dritte Möglichkeit für die Entstehung der elektrischen Ladung kolloider Teilchen ist die „Verunreinigung"

durch Ionen, die dem Kolloid noch von seiner Entstehung her anhaften. Wenn die elektrische Ladung der Kolloidteilchen verringert wird, so verringert sich auch ihre Stabilität, bis es bei völligem Ladungsverlust zur vollständigen Ausfällung kommt. Die Ausfällung kann z. B. durch Wechselwirkung entgegengesetzt geladener Kolloide aufeinander erfolgen; so fällen sich Eiweißkörper, die wegen der Lage ihres isoelektrischen Punktes im sauren Gebiet bei neutraler Reaktion als Anionen dissoziiert sind, also negative Ladung tragen. Auch Neutralsalze wirken auf Kolloidlösungen fällend. Dabei zeigen Suspensions- und Emulsionskolloide bzw. hydrophobe und hydrophile Kolloide ein prinzipiell verschiedenes Verhalten. Hydrophobe Kolloide, wie z. B. Metallsole, werden schon durch kleine Mengen von Neutralsalzen entladen und ausgefällt, und zwar bei positiver Ladung durch Hydroxylionen und Anionen, bei negativer Ladung durch H-Ionen und durch Kationen. Die H- und OH-Ionen sind besonders wirksam, während die Wirksamkeit der übrigen Ionen mit zunehmender Wertigkeit rasch abnimmt. Bei der Einwirkung von H- und OH-Ionen auf hydrophile Kolloide ist bemerkenswert, daß in Abhängigkeit von der H-Ionenkonzentration, sowohl Auflockungen als auch Quellungen hervorgerufen werden können. Es kann also der Hydratationsgrad sowohl ab- als auch zunehmen. Vielleicht hängt das (bei den Eiweißkörpern ist es der Fall) mit einer Änderung des Dissoziationsgrades der Kolloid-Elektrolyte zusammen. Die hydrophilen Kolloide erfordern deshalb größere Salzmengen zur Flockung, und die Fällungen sind meist reversibel. Die Neutralsalze wirken auf die hydrophilen Kolloide von Eiweißkörpern, und zwar auf den osmotischen Druck, Quellung und Viskosität allein nach Maß der Konzentration und Wertigkeit des Anions oder Kations, sowie es die Donnan-Theorie voraussetzen läßt. Es ist bis in die neueste Zeit der Standpunkt von Loeb vertreten worden, daß diese Wirkung der Neutralsalze die einzig wesentliche sei. Demgegenüber steht die vor mehr als 30 Jahren zuerst von F. Hofmeister aufgestellte Lehre, daß die einzelnen Ionen der Neutralsalze auch in spezifischer Stärke die mannigfachen Beziehungen zwischen den hydrophilen Kolloiden und dem Wasser beeinflussen. Es lassen sich nach Hofmeister die Anionen nach der Abnahme ihrer Wirkung auf die Gelatinierung etwa in der Reihe Zitrat, Tartrat, Sulfat, Acetat, Chlorat, Nitrat, Jodid, Rhodanid ordnen. Diese Salze zeigen nach der oben erwähnten Reihe auf deutliche Unterschiede in bezug auf die Quellung von Eiweißkörpern, wobei sie in der vorgenannten Folge quellungserhöhend wirken. In analoger Weise wirken die verschiedenen Salze auf die Temperatur bei der Erstarrung, auf die Erstarrung selbst und auf die Viskosität. Sulfate, Tartrate und Acetate begünstigen wiederum die Gelatinierung und erhöhen die Viskosität. Die Ha-

logene, insbesondere Rhodanide, wirken der Gelatinierung entgegen. Dem Quellungsvorgang steht die Wirkung auf den osmotischen Druck gegenüber. Nach Lillie wird der osmotische Druck von Eiweiß- oder Gelatinelösung durch die Neutralsalze entsprechend der Hofmeisterschen Anionenreihe herabgesetzt.

Ein dritter Parallelprozeß ist die Beeinflussung der Löslichkeit. Hofmeister hat gezeigt, daß jedes Neutralsaz in charakteristischer Stärke wirkt, und zwar haben wir auch hier die Reihe SCN, J, $ClO_3$, $NO_3$, Cl, Acetat, $SO_4$, Tratrat, Zitrat. Weniger deutlich ist die Wirkung von Kationen (Höber).

Auf Grund der Tatsache, daß auch die Wirksamkeit von Fermenten, die gleichfalls wenigstens in ihrem Träger kolloidaler Natur sind, von der Hofmeisterschen Ionenreihe abhängig sein kann (Fürth), haben wir hier geprüft, was für einen Einfluß die Anionen der Hofmeisterschen Ionenreihe auf die Bakterienautolyse entfalten.

Die technische Durchführung dieser Versuchsreihe war die folgende: Die Salze wurden als Natriumsalze gewählt, und zwar in folgender, von Hofmeister aufgestellten Reihe: Zitrat, Tartrat, Sulfat, Acetat, Chlorat, Jodit, Rhodanit. Um den gleichen osmotischen Druck bei allen Salzlösungen zu haben, wurden von ihnen isotonische Lösungen, nämlich mol. 1/30 hergestellt. T. Wohlfeil hat früher für die Herstellung derartiger, für Bakterien isotonischen Lösungen folgende Richtlinien gegeben: Der osmotische Druck hängt bei gleicher Temperatur von der Anzahl der Moleküle in der Raumeinheit und der Stärke der Dissoziation dieser Moleküle, d. h. dem Zerfall in Ionen ab. Es mußte also, streng genommen, zur Herstellung isotonischer Lösungen, bei jedem der obenstehenden Salze neben der molaren Übereinstimmung mit der isotonischen 0,85%igen NaCl-Lösung auch die induviduell verschiedene Dissoziationskonstante der Salze mit eingerechnet werden. Praktisch bedeutet das aber einen sehr geringen und zu vernachlässigenden Fehler, wenn man annimmt, daß die in Frage kommenden Salze bei derart geringen Konzentrationen vollständig dissoziiert sind. NaCl hat ein Molekulargewicht von 78,4. Vorausgesetzt wird, daß die Isotonie gegen Bakterien bei einer Molarität von 8,5 : 58,5 = 0,146 Molarität besteht. Harnstoff ist gar nicht dissoziiert; bei Isotonie muß man daher eine Molarität von $2 \times 0{,}146 = 0{,}292$ voraussetzen. Der Harnstoffwert kann als Ausgangspunkt für die Berechnung der anderen Salze genommen werden. Es ergibt sich dann für $CaCl_2$, das in 3 Ionen dissoziiert $0{,}292 : 3 = 0{,}0973$ als Molarität. Mit diesem Wert muß das Molekulargewicht des $CaCl_2$ multipliziert werden, um die Menge Gramm pro Liter zu erhalten, die einer 0,0292 Harnstofflösung isotonisch ist.

Wir haben die isotonischen Lösungen der betreffenden Salze entsprechend dem obigen Verfahren hergestellt; die Berechnungsdaten sind folgende:

| | Chemische Formel | Molekulargewicht | Dissoziierte Ionen | Erforderliche Molarität | Für isotonische Lösungen |
|---|---|---|---|---|---|
| Na-Zitrat .... | $C_3H_4(COONa)_3$ | 258,04 | 4 | 0,0732 | 18,9 g |
| Na-Tartrat.... | $C_4H_4O_6Na_2 + 4H_2O$ | ohne Wasser 194,1<br>mit Wasser 210,1 | 3 | 0,0973 | 20,5 g |
| Na-Sulfat .... | $Na_2SO_4$ | 142,07 | 3 | 0,0972 | 13,78 g |
| Na-Acetat .... | $C_2H_3O_2Na + 3H_2O$ | ohne Wasser 136,06<br>mit Wasser 190,06 | 2 | 0,146 | 27,75 g |
| Na-Nitrat..... | $Na(NO)_3$ | 85,01 | 2 | 0,146 | 12,4 g |
| Na-Chlorat.... | $NaClO_3$ | 106,46 | 2 | 0,146 | 15,543 g |
| Na-Jodit ..... | $NaJ + 2H_2O$ | ohne Wasser 185,95<br>mit Wasser 239,95 | 2 | 0,146 | 34,9 g |
| Na-Rhodanid . | Na (SCN) | 81 | 2 | 0,146 | 11,826 g |

Da Rhodanid Wasser enthält und die Menge des Wassers unbekannt ist, müssen wir vor dem Gebrauch titrieren. Die Titration wurde nach Volhard ausgeführt, und zwar folgendermaßen: 1000 ccm 1/10 n $HgNO_3$-Lösung = 1/10 HCNS = 5,9088 g HCNS. Man versetzt die Lösung mit einem Überschuß von 1/10 n Silberlösung, säuert mit Salpetersäure an, fügt Eisenammoniumalaun hinzu und titriert mit 1/10 n Rhodankaliumlösung den Überschuß des Silbers zurück. Da Rhodanid an sich eine N-haltige Substanz ist, die bei der Veraschung selbst N freigibt, war ich bei den Rhodanitversuchen gezwungen, entsprechende Lehrbestimmungen für je 5 ccm Suspensionslösung durchzuführen. Die Ergebnisse waren folgende: Zunächst sollen die Proteusversuche besprochen werden (Tabelle XII). Bei der Zitratserie ergab sich eine N-Vermehrung, die bis 96 Stunden voranging, an welchem Zeitpunkt das Maximum erreicht war. Die Bakterienzahl hatte sich dementsprechend bis

72 Stunden vermindert. Nach 96 Stunden ist wieder eine kleine N-Vermehrung eingetreten, die aber doch noch eine Verminderung gegenüber der Ausganskontrolle bedeutete.

Bei der Tartratserie war die N-Vermehrung bis 48 Stunden vor sich gegangen. Nach 72 Stunden ergab sich wieder eine starke Vermehrung, aber kleiner als die 48stündige, und nach 96 Stunden ist wiederum eine N-Vermehrung eingetreten, die die stärkste war. Die Bakterienzahl hatte sich bis 96 Stunden fortlaufend vermindert.

Bei der Sulfatserie hatten wir eine N-Vermehrung, die bis 48 Stunden ging. Nach 72 Stunden war die N-Vermehrung kleiner als die 48stündige, aber doch bedeutend. Bei 96stündiger Bebrütungszeit fanden wir eine N-Vermehrung, die die stärkste war. Die Bakterienzahl hatte sich nach 24 Stunden noch etwas vermehrt. Nach 48 Stunden war jedoch die Verminderung der Bakterienzahl bedeutend. Nach 72 Stunden ist wieder eine kleine Vermehrung zu beobachten gewesen, die aber doch im Vergleich zur Kontrolle als Verminderung betrachtet werden mußte. Nach 96 Stunden hatten wir eine starke Verminderung.

Bei der Acetatserie zeigte sich eine N-Vermehrung bis 96 Stunden, an welchem Zeitpunkt sie am stärksten war. Die Bakterienzahl hatte sich dementsprechend bis 96 Stunden vermindert, nur mit dem Unterschied, daß sie bei 48- und 72stündiger Bebrütungszeit dieselbe geblieben war.

Bei Chlorat fanden wir eine N-Vermehrung bis 48 Stunden. Bis zu 72 Stunden blieb der Autolysen-N der gleiche, um sich nach 96 Stunden wieder zu vermindern. Überall aber war die N-Vermehrung gering. Die Bakterienzahl hatte sich nach 24 Stunden vermindert; nach 48 Stunden ergab sich eine kleine Erhöhung; nach 72 Stunden war wieder eine Verminderung eingetreten, die die gleiche war, wie bei 24 Stunden. Bei 96stündiger Bebrütungszeit war die Bakterienzahl bedeutend vermindert, während die N-Vermehrung gering war.

Bei der Nitratserie war nach 24 Stunden überhaupt keine N-Vermehrung vorhanden; bei 48 Stunden beobachteten wir eine sehr geringe Vermehrung, und bei 72 Stunden hatten wir eine bedeutende N-Vermehrung, die nach 96 Stunden noch stärker wurde. Die Bakterienzahl hat sich nach 24 Stunden wenig vermindert, obwohl wir überhaupt keine N-Vermehrung hatten. Nach 48 Stunden hatten wir dann eine weitere Verminderung, und nach 72 Stunden wurde eine kleine Vermehrung festgestellt, die aber doch im Vergleich zur Kontrolle als Verminderung betrachtet werden mußte. Nach 96 Stunden war die Verminderung stark und im Vergleich mit der ganzen Nitratserie sogar am stärksten.

## Tabelle XII: Hofmeistersche

**Mol. $^1/_{30}$**

| Na-Salze | Sofort | | | nach 24 Stunden | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| Zitrat | 0,014 | — | 528 000 000 000 | 0,322 | +0,308<br>+ 2200 % | 400 000 000 000<br>— 24,2 % |
| Tartrat | 0,042 | — | 452 000 000 000 | 0,292 | +0,250<br>+ 595 % | 388 000 000 000<br>— 14,1 % |
| Sulfat | 0,014 | — | 476 000 000 000 | 0,292 | +0,278<br>+ 1985 % | 524 000 000 000<br>+ 10 % |
| Azetat | 0,028 | — | 428 000 000 000 | 0,448 | +0,420<br>+ 1500 % | 392 000 000 000<br>— 8,3 % |
| Chloral | 0,014 | — | 380 000 000 000 | 0,056 | +0,042<br>+ 300 % | 296 000 000 000<br>— 24,7 % |
| Nitrat | 0,014 | — | 416 000 000 000 | 0,014 | — | 380 000 000 000<br>— 8,6 % |
| Jodid | 0,028 | — | 476 000 000 000 | 0,252 | +0,224<br>+ 800 % | 280 000 000 000<br>— 43,1 % |
| Rhodanid | (6,65)<br>0,022<br>6,672 | — | 440 000 000 000 | 8,52<br>0,85 | +1,85<br>+ 28 %<br>(0,281 %) | 416 000 000 000<br>— 5,4 % |

## Tabelle XIII: Hofmeistersche

**Bei 37°**

| Na-Salze | Sofort | | | nach 24 Stunden | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| Zitrat | 0,014 | — | 524 000 000 000 | 0,518 | +0,504<br>+ 3600 % | 312 000 000 000<br>— 40,4 % |
| Tartrat | 0,014 | — | 336 000 000 000 | 0,334 | +0,320<br>+ 2285 % | 320 000 000 000<br>— 4,7 % |
| Sulfat | 0,070 | — | 396 000 000 000 | 0,280 | +0,210<br>+ 300 % | 320 000 000 000<br>— 19,1 % |
| Azetat | 0,056 | — | 368 000 000 000 | 0,490 | +0,434<br>+ 775 % | 292 000 000 000<br>— 20,6 % |
| Nitrat | 0,028 | — | 430 000 000 000 | 0,070 | +0,042<br>+ 150 % | 392 000 000 000<br>— 8,8 % |
| Chlorat | 0,014 | — | 357 500 000 000 | 0,070 | +0,056<br>+ 400 % | 384 000 000 000<br>+ 7,4 % |
| Jodid | 0,042 | — | 382 000 000 000 | 0,308 | +0,266<br>+ 633 % | 328 000 000 000<br>— 19,3 % |
| Rhodanid | 6,651<br>0,033<br>6,683 | — | 400 000 000 000 | 9,70 | +0,277<br>+ 45,8 % | 392 000 000 000<br>— 2 % |

## Ionenreihe. Versuch. Proteus

**bei 37°**

| nach 48 Stunden | | | nach 72 Stunden | | | nach 96 Stunden | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| 0,364 | +0,350<br>+ 2500 % | 316 000 000 000<br>— 40 % | 0,546 | +0,532<br>+ 3800 % | 284 000 000 000<br>— 46,2 % | 0,602 | +0,588<br>+ 4200 % | 296 000 000 000<br>— 43,9 % |
| 0,406 | +0,464<br>+ 1104 % | 300 000 000 000<br>— 33,6 % | 0,504 | +0,462<br>+ 1100 % | 262 000 000 000<br>— 42 % | 0,518 | +0,476<br>+ 1133 % | 180 000 000 000<br>— 57,1 % |
| 0,378 | +0,364<br>+ 2600 % | 320 000 000 000<br>— 32,7 % | 0,336 | +0,322<br>+ 2300 % | 336 000 000 000<br>— 29,4 % | 0,406 | +0,392<br>+ 2800 % | 176 000 000 000<br>— 63 % |
| 0,532 | +0,504<br>+ 1800 % | 320 000 000 000<br>— 25,2 % | 0,658 | +0,630<br>+ 2250 % | 320 000 000 000<br>— 25,2 % | 0,966 | +0,938<br>+ 3350 % | 144 000 000 000<br>— 66,3 % |
| 0,084 | +0,070<br>+ 500 % | 328 000 000 000<br>— 15,7 % | 0,084 | +0,070<br>+ 500 % | 296 000 000 000<br>— 22,1 % | 0,028 | +0,014<br>+ 100 % | 240 000 000 000<br>— 38,8 % |
| 0,028 | +0,014<br>+ 100 % | 318 000 000 000<br>— 23,5 % | 0,308 | +0,294<br>+ 2100 % | 328 000 000 000<br>— 21,1 % | 0,366 | +0,322<br>+ 3014 % | 240 000 000 000<br>— 42,3 % |
| 0,406 | +0,378<br>+ 1350 % | 336 000 000 000<br>— 29,4 % | 0,572 | +0,544<br>+ 1942 % | 264 000 000 000<br>— 46,2 % | 0,588 | +0,560<br>+ 2000 % | 240 000 000 000<br>— 49,5 % |
| — | — | 336 000 000 000<br>— 23,6 % | 7,33<br>(0,733) | 0,061<br>+ 10,2 %<br>+ 102 % | 276 000 000 000<br>— 37,2 % | 9,3<br>(0,95) | +0,25<br>+ 39,8 %<br>(0,398 %) | 304 000 000 000<br>— 30,9 % |

## Ionenreihe. Versuch. Coli

**Mol. $^1/_{30}$**

| nach 48 Stunden | | | nach 72 Stunden | | | nach 96 Stunden | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl | N-mg in 5 ccm | Veränderung gegen Kontrolle | Bakterienzahl |
| 0,560 | +0,546<br>+ 3900 % | 264 000 000 000<br>— 49,8 % | 0,490 | +0,476<br>+ 3400 % | 188 000 000 000<br>— 64,1 % | 0,658 | +0,644<br>+ 4628 % | 280 000 000 000<br>— 46,5 % |
| 0,322 | +0,308<br>+ 2200 % | 220 000 000 000<br>— 34,5 % | 0,476 | +0,462<br>+ 3300 % | 224 000 000 000<br>— 33 % | 0,602 | +0,588<br>+ 4200 % | 236 000 000 000<br>— 29,7 % |
| 0,364 | +0,294<br>+ 420 % | 320 000 000 000<br>— 19,1 % | 0,392 | +0,322<br>+ 460 % | 296 000 000 000<br>— 25,2 % | 0,518 | +0,448<br>+ 640 % | 184 000 000 000<br>— 53,5 % |
| 0,504 | +0,448<br>+ 800 % | 268 000 000 000<br>— 29,8 % | 0,574 | +0,518<br>+ 925 % | 164 000 000 000<br>— 55,4 % | 0,604 | +0,548<br>+ 978 % | 188 000 000 000<br>— 48,9 % |
| 0,126 | +0,098<br>+ 350 % | 376 000 000 000<br>— 12,5 % | 0,126 | +0,098<br>+ 350 % | 312 000 000 000<br>— 27,4 % | 0,90 | +0,872<br>+ 3124 % | 292 000 000 000<br>— 32,3 % |
| 0,028 | +0,014<br>+ 100 % | 364 000 000 000<br>+ 1 % | 0,056 | +0,042<br>+ 300 % | 360 000 000 000<br>+ 0,69 % | 0,140 | +0,126<br>+ 900 % | 288 000 000 000<br>— 19,4 % |
| 0,308 | +0,266<br>+ 633 % | 342 000 000 000<br>— 10,4 % | 0,378 | +0,336<br>+ 800 % | 348 000 000 000<br>— 8,9 % | 0,756 | +0,714<br>+ 1700 % | 272 000 000 000<br>— 28,7 % |
| 7,81 | 1,76<br>17,4 % | 292 000 000 000<br>— 27 % | 8,51 | +0,169<br>+ 27,9 % | 280 000 000 000<br>— 30 % | 6,10 | —0,041<br>— 6,7 % | 324 000 000 000<br>— 19 % |

Bei Jodid wurde eine fortschreitende Autolysen-N-Vermehrung bis zu 96 Stunden beobachet. Die Bakterienzahl hatte sich nach 24 Stunden stark vermindert. Nach 48 Stunden ergab sich eine kleine Vermehrung, die nach 72 Stunden wieder in eine starke Verminderung bis zu 96 Stunden überging.

Bei der Rhodanidserie war die N-Vermehrung, soweit sie durch die Kontrollanalysen festzustellen war, sehr gering, und zwar lag ihr Maximum bei 72 Stunden.

Bei dem Coliversuch waren die Ergebnisse wie folgt: Der Versuch wurde unter denselben technischen Bedingungen durchgeführt wie bei Proteus (Tabelle XIII).

Bei der Zitratserie war nach 24 Stunden schon eine starke Vermehrung eingetreten, die bis 48 Stunden weiterging. Bei 72 Stunden war sie nicht so groß wie bei 48 Stunden, mußte aber doch als stark bezeichnet werden. Nach 96 Stunden war sie am stärksten. Die Bakterienzahl hatte sich bis 72 Stunden vermindert. Es war dies die stärkste Verminderung, während die N-Vermehrung bei 72 Stunden im Vergleich mit allen anderen die kleinste war.

Bei der Tartratserie hatten wir nach 24 Stunden eine starke N-Vermehrung. Nach 48 Stunden trat eine kleine Verminderung ein; die N-Vermehrung war aber immerhin noch stark. Während 72 Stunden bis zu 96 Stunden ging sie graduell weiter und war nach 96 Stunden am stärksten. Die Verminderung der Bakterienzahl verlief dementsprechend bis zu 48 Stunden. Nach 72 Stunden war eine sehr geringe Erhöhung der Zahl eingetreten; nach 96 Stunden dann eine weitere geringgradige Erhöhung, die aber doch noch als eine starke Verminderung gegenüber der Ausgangskontrolle gelten konnte.

Bei der Sulfatserie war die N-Vermehrung von 24stündiger Bebrütung bis zu 96 Stunden weitergegangen, wobei sie nach 96 Stunden am stärksten von allen Bebrütungszeiten dieser Serie gefunden worden ist. Die Bakterienzahl hat sich graduell vermindert, bei 24 und 48 Stunden war sie dieselbe geblieben.

Bei der Acetatserie fand sich eine N-Vermehrung fortschreitend bis zu 96 Stunden, nach welcher (96stündiger) Bebrütungszeit sie am stärksten war. Die Bakterienzahl hatte sich in gleichförmiger Weise bis 72 Stunden vermindert. Nach 96 Stunden war eine kleine Vermehrung der Bakterienzahl eingetreten, aber die Verminderung gegenüber der Ausgangskontrolle blieb doch im allgemeinen stark.

Wenn man nun sämtliche Versuchsserien miteinander vergleicht, ergeben sich klare Regeln für die durchschnittliche Wirksamkeit der verschiedenen Anionen. Die größte N-Vermehrung bzw. die stärkste Autolyse geschah in jenen Anionenlösungen (Natriumsulfat, Natriumtartrat,

Natriumzitrat, Natriumacetat), die nach Hofmeister als quellungsvermindernd bzw. die Gelatinierung befördernd gefunden worden waren.

Die geringste N-Vermehrung bzw. die geringste Autolyse hat in Salzlösungen (Natriumchlorat, Natriumchlorid, Natriumnitrat, Natriumrhodanid mit Ausnahme des Jodids) stattgefunden, die nach Hofmeister als quellungserhöhende bzw. die Gelatinierung verhindernde zu betrachten sind.

Die absolut stärkste Autolyse war in Natriumacetat und Natriumzitratlösungen zu beobachten, und die geringste Autolyse lag bei Natriumrhodanid und Natriumchloratlösungen. Man kann bei diesen letzten beiden Salzlösungen fast sagen, daß eine Hemmungswirkung der Autolyse vorgelegen hat. Ob es sich bei diesen Förderungen und Hemmungen der Autolyse durch die vorgenannten Anionen um eine solche auf die autolytischen Zellfermente handelte oder ob die Anionenwirkungen nur als unspezifische, den Kolloidzustand des Bakterieneiweisses beeinflussende Faktoren aufzufassen sind, können wir zunächst noch nicht sicher entscheiden. Oparin hatte gefunden, daß die mehrwertigen Salze die Fermentprozesse weniger hemmen als die Salze einwertiger Basen und Säuren. Die eigenen Ergebnisse haben diese Feststellungen auf die bakterielle Autolyse erweitert.

Die geprüften Na-Salze der mehrbasigen Säuren (Sulfate, Tartrate, Zitrate, Phosphate) hatten eine autolysenverstärkende Wirkung, während diese bei den Salzen der einbasigen Säuren (Chloride, Nitrate, Rhodanide, Chlorate) nicht festzustellen war.

# ZUSAMMENFASSUNG UND BESPRECHUNG DER EINZELERGEBNISSE

Aus den vorgenannten Versuchsserien über die Bedingungen des Autolysenablaufes bei Bakterium Proteus X19 und Bakterium Coli Commune haben sich eine Reihe von Regeln ergeben, die im folgenden noch einmal zusammengefaßt werden sollen. Auf eine weitgehende theoretische Erklärung will ich hier zunächst noch verzichten. Jedoch scheint es nach den bisherigen Resultaten wahrscheinlicher zu sein, daß die bakterielle Autolyse durch bakterieneigene Zellfermente zustande kommt, als das sie aus unspezifischen katalytischen Prozessen mit Zerfall des Bakterieneiweisses der abgestorbenen Mikroben erklärt werden könnte. Da das Optimum dieser autolytischen Prozesse bei leicht alkalischer Reaktion (pH = 8,0) gelegen ist, kann es sich nicht um die Fermente vom Typ der Papainasen handeln. Eher könnte man an solche denken, die zwischen den Tryptasen und Papainasen stehen. Auch Maschmann fand, daß die bisher geprüften bakteriellen eiweißspaltenden Fermente (hauptsächlich bei Anaerobiern) mit keinem der bisher bekannten Proteasen im Tierkörper, aber auch nicht mit den Papainasen, genau übereinstimmten. Im einzelnen wurden folgendes gefunden:

1. Die Stärke der Autolyse stand in dem Sinne zur Bebrütungszeit in Beziehung, daß das Maximum im allgemeinen bei 72 bis 96 Stunden Brutschrankaufenthalt gelegen war. Jedoch wurde das Maximum von anderen Faktoren, wie Temperatur, Bakterienmenge usw., außerdem noch abhängig gefunden.

2. In bezug auf die Wasserstoffionenkonzentration der Reaktionsflüssigkeit wurde das Maximum der Autolyse bei einem pH = 8,0 festgestellt. In einem pH-Bereich von 6 bis 7 war die Autolyse außerordentlich gering. Erst von neutraler Reaktion an bis in das Gebiet des leicht Alkalischen ließen sich stetig zunehmende Autolysenvorgänge feststellen.

3. Die Bakterienmenge hatte auf die Stärke der Autolyse insofern einen Einfluß, als mit steigernder Bakterienzahl auch die Autolyse in annähernd gleicher Proportion anstieg.

4. Eine sehr wesentliche Einwirkung des osmotischen Druckes auf die Autolyse war nicht festzustellen, jedenfalls nicht in einem Molaritätenbereich von 1/15 bis 1/60 Lösung.

5. Die Temperatur spielte nach unseren Versuchen eine besonders wichtige Rolle bei der Autolyse. Die größten Autolysenwerte wurden bei einer Temperatur von $45^0$ gefunden. Die Stärke der Autolyse

nahm von $4^0$ bis zu $45^0$ zu, bei Temperaturen über $45^0$ bis zu $60^0$ jedoch wieder ab. Die Beschleunigung der Autolyse durch Temperaturerhöhung von $4^0$ auf $20^0$ trat besonders bei Bakterium Coli in Erscheinung. Bakterium Proteus war bereits bei $4^0$ autolysierbar und erfuhr deswegen nicht eine so starke Beschleunigung durch die vorgenannte Temperaturerhöhung.

6. Es ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Autolysenstärke von dem Vorhandensein bestimmter Anionen in der Aufschwemmungsflüssigkeit. Von den Natriumsalzen der Hofmeisterschen Ionenreihe verstärkten die Salze mehrbasiger Säuren (Sulfate, Tartrate, Zitrate usw.) die Autolyse ganz besonders. Demgegenüber war die Autolyse in den Salzlösungen mit Salzen einbasiger Säuren gering. Eine Ausnahme macht nur das Natriumjodid und das Natriumacetat, bei denen gleichfalls etwas stärkere Autolyse gefunden wurde.

An dieser Stelle fühle ich mich verpflichtet, meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Wohlfeil, meinen aufrichtigsten Dank nicht nur für freundliche Überlassung des Themas, sondern überhaupt für das außerordentlich liebenswürdige Interesse, das er meiner allgemeinen weiteren wissenschaftlichen Ausbildung entgegenbrachte, auszusprechen. Ich knüpfe daran die Versicherung, daß ich auch in Zukunft bestrebt sein werde, seinen wissenschaftlichen Lehren zu folgen. Es war mir eine große Ehre, mich zu seinen Schülern rechnen zu dürfen.

Dem Herrn Präsidenten des Robert-Koch-Institutes, Herrn Professor Dr. Reiter, wie auch dem Vizepräsident, Herrn Professor Dr. Gildemeister, gestatte ich mir, für das lebhafte Interesse und die freundliche Unterstützung, die sie meinen wissenschaftlichen Studien in Deutschland angedeihen ließen, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Diese Arbeit wurde mir zum Teil durch ein Deutschland-Stipendium des Mitteleuropäischen Wirtschaftstages und des Deutschen Akademischen Auslanddienstes ermöglicht, und ich nehme auch an dieser Stelle nochmals gerne Veranlassung, hierfür meinen aufrichtigsten Dank zum Ausdruck zu bringen.

# LITERATURVERZEICHNIS


Anderson, C. G.: „An Introduction to Bacteriological chemistry", Edin burg Ess-Livingstone, 1938.

Anson, M. L.: Science 81 (1935) S. 467.

Beger, C. und Fingerling, G. und Morgen, A.: „Über die N-Bestimmung nach Kjehldahl im Kreatinin", Bioch. Zeitschrift Bd. 81, 1917.

Bersin, Th.: „Kurzes Lehrbuch der Enzymmologie", Akadem. Verlagsgesellschaft, 1938.

Buchner, E. und Haen: Bioch. Zeitschrift Bd. 26 (1917) S. 171.

Conradi, H.: Dtsch. med. Wschr. 1903 Nr. 2.

Dernby, H. und Walbum: Bioch. Zeitschrift Bd. 134 (1923) S. 536.

Dernby, K. G. und Walbum, C. E.: Bioch. Zeitschrift Bd. 134 (1923).

Dernby, K.: Bioch. Zeitschrift Bd. 81 (1917).

Euler, H. v.: „Chemie der Enzyme", Verlag von Bergmann, München 1934.

Euler, H. v.: „Neuere Ergebnisse an enzymatischen Oxyditations- und Reduktions-Systemen", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. 3.

Fodor, A.: „Mechanismus der Enzymwirkung", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. 1.

Fuhrmann: „Bakterienenzyme", Jena 1907.

Gorbach, G. und Schönbeck, H.: Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Abt. I 141, 307 (1932); ders., u. Ulm, R.-Arch. f. Elektr. Bd. 6 (1935).

Gorini, C.: Zentralbl. f. Bakter. Kongreßbericht Abt. I 939.

Gorini, C.: „Ulteriori Ricerche sulle Proteasi degli Acidoproteoliti", Milano 1935, Verlag Ulrico Hoepli.

Grassmann, W. und Schneider, Ferd.: „Proteasen", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. V.

Grassmann, W., Dyckerhoff, H. und Eibeler: „Über die enzymatische Spaltung des Glutathions", Hoppe-Seyler, physiol. Bd. 189.

Grassmann, W., Gorini und Schleich: Hoppe-Seylers Zeitschrift phys. Ch. Bd. 205 (1931).

Grassmann, W.: „Proteolytische Enzyme des Tier- und Pflanzenreiches", Ergebnisse der Emzymforschung Bd. 1.

Haen und Leopold: Z. Untersuchg. Lebensmittel Bd. 67 (1934) S. 50.

Haen, Hugo: „Autolyse", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. V.

Hahn und Harpuder: Zeitschrift für Biol. 71 (1920) S. 302.

Hoeber: „Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe", Verlag Engelmann, Leipzig 1926.

Jahnke, A.: Zentralbl. f. Bakter. Kongreßbericht Abt. I 939.

Jakoby, M.: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 30 (1900) S. 149.

Jakoby, M.: Hoffm. Beitr. Bd. III (1903) S. 446.

Jakoby, M.: Bioch. Zeitschrift Bd. 92 (1918).

Karrer: „Lehrbuch der organischen Chemie", Verl. Thieme, Leipzig 1937.

Karstroem, H.: „Enzymatische Adaptation bei Mikroorganismen", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. VII.

Kiesel, A. und Kusmin, S.: Zeitschrift für Phys. Ch. Bd. 238.

Kraut, H. und Pantschenko-Jurewicz: Bioch. Zeitschrift Bd. 275 (1935) S. 114.

Kruse, W.: „Allgemeine Mikrobiologie", Leipzig 1910.

Lehnartz, E.: „Einführung in die physiologische Chemie", Verlag Jul. Springer, Berlin 1937.

Lichtwitz, L., Liesegang, Spiro: „Medizinische Kolloidlehre", Verlag Theod. Steinhoff, 1937.

Michaelis, Leon.: „Die Wasserstoffionenkonzentration", Verlag Jul. Springer, 1922.

Myrbäck, K.: „Co-Zymase", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. II.

Maschmann, E.: Zentr. f. Bakter., Parasit. u. Infektionskr. Abt. I Originale Bd. 140 Heft 3/8 (Beiheft).

Maschmann, E. und Helmert: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 223 (1934).

Maschmann, E. und Helmert: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 228 (1934).

Maschmann, E. und Helmert: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 279 (1935).

Maschmann, E. und Helmert: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 231 (1935).

Maschmann, E. und Helmert: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 222 (1933).

Maschmann, E. und Helmert: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 280 (1935).

Maschmann, E. und Helmert: Hoppe-Seylers Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 228 (1934).

Mittasch, H.: „Katalyse und Determinismus", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. VII.

Nikolai, H. W. und Kageura, N.: Bioch. Zeitschrift Bd. 196 (1928).

Nord, F. F.: „Physikalisch-chemische Vorgänge bei Enzymreaktionen", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. I.

Northrop, J. H.: Naturwiss. Bd. 11 (1932) S. 713.

Northrop, J. H. und Kunitz, M.: Ergebn. der Enzymforschg., Bd. 2.

Northrop, J. H.: Cen. physiol. Bd. 16 (1933) S. 615.

Northrop, J. H.: „Krystalline Pepsin", Ergebn. der Enzymforschg. B. I.

Oparin: „Die Wirkung der Fermente in der lebenden Zelle", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. 3.

Oppenheimer, C.: „Bakterienenzyme", Handbuch der pathog. Mikr. Bd. 2, S. 1195.

Oppenheimer, C.: „Die Fermente und ihre Wirkung", Leipzig 1924—1926.

Otto, R. und Munter, H.: „Bakterienauflösende Fermente", Ergebn. d. Hygiene und Bakt. Bd. 6 (1934).

Palladin: Fortschr. d. naturw. Forschg. Bd. 1 (1910).

Pikunssen: „Mikrometrik", Verlag Springer.

Quastel, H.: „Bakterial Enzyme Reaction", Ergebn. der Enzymf. Bd 1.

Rona, P.: „Praktikum der physikal. Chemie", Verlag Springer, 1926.

Rona und Mislowitzer: Bioch. Zeitschrift Bd. 140 (1923).

Rona und Mislowitzer: Bioch. Zeitschrift Bd. 146 (1924).

Rona, P. und Nikolai, H. W.: Bioch. Zeitschrift Bd. 172 (1926).

Salkowsky, E.: Zeitschrift Kln. Med. Bd. 17 Suppl.-Bd. (1891) S. 72.

Scholmeyer, J.: Zentr. f. Bakt. Parasit. u. Infekt.-Abt. I Bd. 142 (1938).

Schwarz, C.: Bioch. Zeitschrift Bd. 156 (1925) S. 130.

Shiga, M. und Neisser, M.: Dtsch. Med. Wschr. 1903 S. 61

Siegmund Fraenkel: Bioch. Zeitschrift Bd. 115 (1920).

Spek, Josef: „Das ph in der lebenden Zelle", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. VI.

Starkestein, E.: Bioch. Zeitschrift Bd. 47 (1912).

Steppuhn, O., Pewsner, G. und Timofejewa, A.: Bioch. Zeitschrift, Bd. 175 (1926).

Soerensen und Pedersen: Zeitschrift für Ph. Ch. Bd. 39.

Tammann, G.: Zeitschrift d. Ph. Hoppe-Seyler Bd. 16.

Theorell, H.: Bioch. Zeitschrift Bd. 272 (1934) S. 155.

Theorell, H.: „Das gelbe Ferment", Ergebn. d. Enzymforschg. Bd. VI.

Virtanen, A.: Intern. Mejeri Kongress 1931 2 Sektion S. 301, Kopenhagen.

Wagner, Jauregg, Th.: „Eiweiß als Bestandteil von Fermenten", Chemie und Physiologie des Eiweißes von R. Otto und F. Felix, 1938.

Warburg, O.: „Chemische Konstitution von Fermenten", Ergebnisse der Enzymforschung Bd. VII.

Warburg, O.: Bioch. Zeitschrift Bd. 172 (1924).

Warburg, O. und Christian, W.: Bioch. Zeitschrift Bd. 254 (1932) S. 438.

Willstaetter und Grassmann: Hoppe-Seyler Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 153 (1926) S. 250.

Willstaetter, R. und Rohdewald, M.: Hoppe-Seyler Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 225 (1934) S. 103.

Willstaetter, R. und Rohdewald, M.: Hoppe-Seyler Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 229 (1934) S. 242.

Willstaetter, R. und Rohdewald, M.: Hoppe-Seyler Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 218 (1933) S. 77.

Willstaetter, R. und Rohdewald, M.: Hoppe-Seyler Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 204 (1932) S. 181.

Willstaetter, R. und Rohdewald, M.: Hoppe-Seyler Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 208 (1932) S. 258.

Willstaetter, R., Kuhn, R. und Sobotka: Hoppe-Seyler Zeitschrift physiol. Ch. Bd. 81 (1923) S. 33.

Wohlfeil, Th.: „Bakterielle Fermente und ihre Beziehungen zur Krankheitsentstehung und zum Krankheitsverlauf", Klin. Wschr.

Wohlfeil, T.: Zentralblatt f. Bakt., Parasit. u. Infekt. Abtlg. I Bd. 135.

Wohlfeil, T.: Zentralblatt f. Bakt. u. Parasit. u. Infekt. Abtlg. I, Bd. 127 (1933).

Wohlfeil, T.: Ergebn. f. Hyg. u. Infekt. 1936 Bd. 119 S. 119.

Zsigmondy, R.: „Kolloid Chemie", Verlag Otto Spamer, Leipzig 1925.

# Lebenslauf

Ich wurde am 26. Juli 1911 in Athen geboren. Von meinem fünften Lebensjahre ab habe ich ein französisches Internat auf der Insel Kreta besucht und trat später in das Athener Lyzeum ARSAKION ein. Während der letzten beiden Schuljahre besuchte ich ein erstes Athener Gymnasium und ließ mich nach bestandenem Abiturium in der medizinischen Fakultät der Athener Universität immatrikulieren.

Nach meinem Studium trat ich am bakteriologischen Laboratorium des Städtischen Krankenhauses „ELPIS“ in Athen als Volontärin ein, wurde später angestellt und verblieb dort, bis ich im Juli 1937 mit einem deutschen Stipendium beehrt wurde. So bin ich seit dem 17. November 1937 bis heute am Institut „Robert Koch“ tätig, woselbst ich die angefügte Arbeit ausgeführt habe.

Druck: Buchgewerbehaus M. Müller & Sohn, Berlin SW 68